

Methodenentwicklung in der Kapillarelektrophorese

Trennungen von Polymeren
und Enantiomeren
Mizellarelektrokinetische Chromatographie
Probenfokussierung

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)
genehmigte
Dissertation

von
Stefan Günter
aus Ochsenfurt

1. Referent: Prof. Dr. H. Wätzig

2. Referent: Prof. Dr. W. Kliegel

eingereicht am: 21.7.2003

mündliche Prüfung (Disputatio) am: 31.10.2003

2003

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich

Herrn Prof. Dr. Hermann Wätzig

für seine jederzeit gewährte freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft danken.

Ferner gilt mein Dank sowohl meinen Braunschweiger Kollegen Julia Hille, Udo Schepers, Michael Graf, Heidi Köppel und Jens Ohnesorge als auch meinen ehemaligen Würzburger Kollegen Dr. Bernhard Schirm, Dr. Stefan Kaupp und Dr. Matthias Degenhardt sowie Dr. Nesrin Gökhan (Hacettepe-Universität Ankara).

Ganz besonders möchte ich mich für das Korrekturlesen meiner Arbeit bei Dr. Annette Kunkel und Dr. Leo Baur bedanken.

Dann möchte ich noch die technische Unterstützung durch Leandro dela Cruz (ThermoFinnigan), Herrn Looft, Herrn Beyerlein und Herrn Warren (Unicam) sowie durch Frank Roese und Klaus Hartmann (Braunschweig) und Georg Walter (Würzburg) nicht unerwähnt lassen.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kliegel für die Übernahme des Koreferates.

Veröffentlichungen

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

S. Günter, M. Degenhardt, H. Wätzig

„Trennung von Polymeren durch Kapillarelektrophorese mit Hilfe von Trimellitsäure-Puffer mit Polymerzusätzen“

Doktorandentagung, 11.-13.3.1999, Freiburg im Breisgau

Archiv der Pharmazie 1999, 332 (Suppl.1), 33.

N. Gökhan, S. Günter, H. Wätzig

„Improving the detection limit by field amplified sample stacking (FASS) methods in capillary electrophoresis“

3. EGSM, 23.-25.2.2001, Frankfurt am Main

<http://www.foncl.de/AKW/Poster.pdf>.

Für meine Eltern und meine Oma

“Der Weg wächst im Gehen
unter Deinen Füßen“

(Reinhold Schneider)

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	III
Veröffentlichungen	V
Inhaltsverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Grundlagen der CE	1
1.1.1 Elektrophoretische Mobilität	3
1.1.2 Elektroosmotische Mobilität	5
1.1.3 Bruttomobilität	8
1.1.4 Injektion	9
1.2 Methoden in der Kapillarelektrophorese	11
1.2.1 Kapillarzonenlektrophorese	11
1.2.2 Kapillarelektrophorese unter Zusatz polymerer Hilfsstoffe	13
1.2.3 Mizellare Elektrokinetische Chromatographie	19
1.2.4 Chirale Trennungen	21
1.2.5 Kapillarelektrophorese mit Probenfokussierung	23
1.2.6 Indirekte Detektion	24
1.2.7 Andere Methoden	26
2 Aufgabenstellung	27
3 Trennung von Polymeren	29
3.1 Vorstellung der untersuchten Polymere	29
3.2 Bestimmung der relativen molaren Massen von Polyacrylsäuren	30
3.2.1 Allgemeines	30
3.2.2 HPLC-Methode	31
3.2.3 CE-Methode	31
3.2.4 Möglichkeiten zur Trennung von Polyacrylsäuren verschiedener Kettenlänge	32
3.2.5 Vorstellung zweier CE-Methoden	32
3.3 Trennungen ohne Zusatz von Polymeren	33
3.4 Pentosanpolysulfat	34
3.4.1 Zusatz von Agarose	40
3.4.2 Zusatz von Dextran	41
3.5 Chondroitinsulfat, Heparin und Polygalacturonsäure	43

3.6 Substanz PA	48
3.7 Experimentelles	49
3.8 Zusammenfassung der bisher erzielten Trennungen	50
3.9 Diskussion	51
4 Trennung von Taurolidin von seinen Verunreinigungen	53
4.1 Verwendung und Darstellung	53
4.2 Bisher verwendete Methoden	55
4.3 Trennungen von Taurolidin mit einer FZCE-Methode	56
4.4 Trennungen von Taurolidin mit einer MEKC-Methode	57
4.4.1 Natriumtetraborat / SDS-Puffer (je 100 mM, pH = 9)	57
4.4.2 Natriumtetraborat / SDS-Puffer (je 100 mM, pH ≤ 9)	60
4.4.3 Läufe unter Zusatz von Formaldehyd	61
4.4.4 Natriumtetraborat-SDS / Acetonitril	63
4.4.5 Natriumtetraborat-SDS / 1-Hexanol	64
4.4.6 Natriumtetraborat-SDS / Harnstoff	65
4.4.7 Natriumtetraborat-SDS / Cyclodextrine	66
4.4.8 Natriumtetraborat-SDS / Ethylenglykol	67
4.4.9 Natriumtetraborat-Puffer mit unterschiedlichen SDS-Konzentrationen	69
4.5 Trennungen von Taurolidin unter Zusatz anderer Mizellbildner als SDS	71
4.5.1 Brij 35 P	71
4.5.2 Triton X-100	72
4.5.3 Tween 20	72
4.5.4 Lithiumperfluorooctansulfonat (LiPFOS)	74
4.5.5 Cholsäure	76
4.5.6 Deoxycholsäure	78
4.6 Verwendete Substanzen	79
4.7 Tabellarische Darstellung der Ergebnisse	81
4.8 Diskussion	82
5 Trennung von Enantiomeren	83
5.1 Trennung von Tramadol-ähnlichen Substanzen	83
5.1.1 Bedeutung von Tramadol	83
5.1.2 Trennung von Tramadol und drei unbekannten Derivaten in ihre Enantiomere	84

5.2 Versuch der Trennung eines Enantiomerengemisches eines Prolin-Derivates	90
5.2.1 Eigenschaften von Prolin	90
5.2.2 Versuch der Trennung eines Enantiomerengemisches eines Prolin-Derivates	90
5.3 Trennung von Racematen verschiedener Aminosäuren	95
5.3.1 Experimentelles	95
5.4 Diskussion	98
6 Strategie zur Senkung der Detektionsgrenze in der Kapillarelektrophorese	99
6.1 Vorstellung der Modellsubstanzen	99
6.2 Probenfokussierung durch Feldverstärkung ("Field amplified sample stacking", FASS)	100
6.2.1 Probenfokussierung mit hydrodynamischer Injektion (FASS)	100
6.2.2 Probenfokussierung mit elektrokinetischer Injektion (FAI)	101
6.3 Ergebnisse mit dem Meßgerät Crystal CE 310 der Firma Unicam (s. Kap. 10)	102
6.3.1 Hydrodynamische Probeninjektion (FASS)	102
6.3.2 Elektrokinetische Probeninjektion (FAI)	104
6.4 Übertragung der Methode auf ein anderes Meßgerät (SpectraPhoresis 1000, s. Kap. 10)	106
6.4.1 Hydrodynamische Probeninjektion (FASS)	107
6.4.2 Elektrokinetische Probeninjektion (FAI)	108
6.5 Entwicklung einer Methode für Neostigminbromid	112
6.6 Diskussion	113
7 Fehlersuche in der Kapillarelektrophorese	115
7.1 Strom- bzw. Spannungsprobleme	115
7.2 Fehlen von Peaks	116
7.3 Auftreten von unerwarteten Peaks	117
7.4 Schlechte Peakform	118
7.5 Schlecht reproduzierbare Migrationszeiten	118
7.6 Schlecht reproduzierbare Peakflächen	118
7.7 Sonstiges	119
7.8 Tabellarische Zusammenfassung	120
8 Zusammenfassung und Ausblick	123
9 Abkürzungsverzeichnis	125
10 Experimentelles	127
11 Literaturverzeichnis	133

Lebenslauf _____ *A1*

Weitere Veröffentlichungen _____ *A3*

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der CE

Die Kapillarelektrophorese ist eine leistungsfähige Trenntechnik für verschiedene Ionen in englumigen (10-100 μm), mit einer Elektrolytlösung gefüllten Kapillaren [1-3]. Der Aufbau eines CE-Gerätes ist in Abb. 1.1 schematisch dargestellt [4].

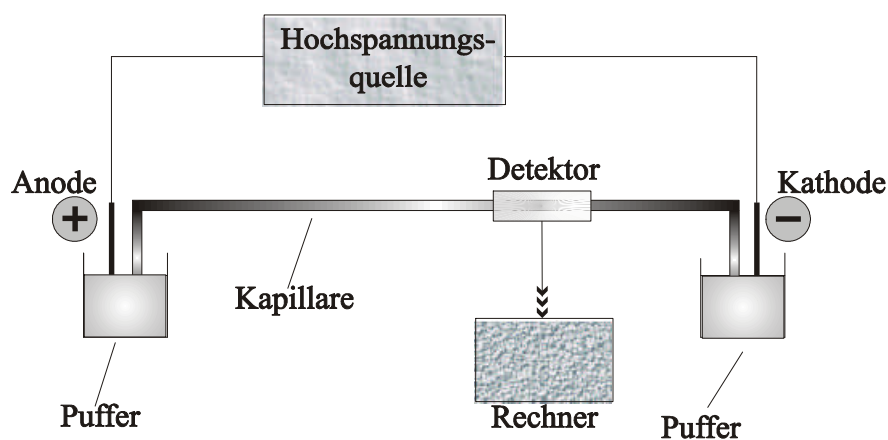


Abb. 1.1: Aufbau eines CE-Gerätes (vgl. [5])

Der Hauptbestandteil eines CE-Gerätes ist die Kapillare, die aus auch für die GC üblichem Kieselglas hergestellt wird. Sowohl die beiden Enden der Kapillare als auch die Elektroden der Hochspannungsquelle tauchen in ein Puffergefäß ein. Ein am Auslaßende der Kapillare angebrachter Detektor (in den meisten Fällen wird ein UV-Detektor verwendet) liefert ein der Substanzmenge entsprechendes Signal, welches normalerweise mit einem Rechner weiterverarbeitet wird.

Um eine Trennung durchzuführen, wird die Kapillare zunächst entsprechend der jeweiligen Methode vorbereitet („konditioniert“ und „äquilibriert“, s. Kap. 10, Experimentelles), um stabile Bedingungen zu erreichen. Dann wird in die mit Puffer gefüllte Kapillare entweder hydrodynamisch (mit Über- oder Unterdruck) oder elektrokinetisch (durch Anlegen von Spannung) die Probe injiziert. Nach der Injektion wird das Probengefäß wieder durch ein

Puffergefäß ersetzt, und durch Anlegen von Hochspannung (bis 30 kV) wird die Elektrophorese gestartet.

Während der Elektrophorese wird die elektrische Leistung (bis zu 7 W) in Joulesche Wärme umgesetzt. Deshalb werden, wie bereits oben erwähnt, Kapillaren mit einem Durchmesser von nur 10-100 μm benutzt. Diese haben ein großes Oberflächen-Volumenverhältnis, wodurch die Wärme gut abgeleitet werden kann. Außerdem werden auch Radialdiffusion und Konvektion verringert.

In den folgenden Abschnitten soll näher auf die Theorie der Kapillarelektrophorese eingegangen werden.

1.1.1 Elektrophoretische Mobilität

Beim Anlegen einer Spannung wandern elektrisch geladene Teilchen in Lösung zu der ihnen entgegengesetzt geladenen Elektrode. Bei einer durch Elektrophorese hervorgerufenen Trennung wird das Verhalten der Analyten im elektrischen Feld genutzt.

Die elektrische Kraft, die bei einer angenommenen „unendlichen“ Verdünnung, bei welcher keine ionischen Wechselwirkungen mehr auftreten würden, wirksam wäre, kann mit folgender Gleichung beschrieben werden:

$$F_{el} = z_i \cdot e_0 \cdot E \quad \text{Gl. 1.1}$$

z_i = Anzahl der Ladungen pro Teilchen i

e_0 = Elementarladung [$1,602 \cdot 10^{-19}$ C]

E = elektrische Feldstärke [$\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$]¹

Neben der elektrischen Kraft F_{el} wirkt auf ein Teilchen, das sich in einem viskosen Medium bewegt, nach Stokes die Reibungskraft F_{re} :

$$F_{re} = 6 \cdot \pi \cdot r_i \cdot \eta \cdot v_{ep} \quad \text{Gl. 1.2}$$

r_i = Radius des Teilchens i [cm]

η = Viskosität des Mediums [Pa·s]

v_{ep} = Wanderungsgeschwindigkeit des Teilchens [$\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$]

Die Reibungskraft wirkt der beschleunigenden elektrischen Kraft entgegen. Eine konstante Wanderungsgeschwindigkeit v_{ep} des Teilchens wird erreicht, wenn F_{re} und F_{el} im Gleichgewicht sind:

$$v_{ep} = \frac{z_i \cdot e_0}{6 \cdot \pi \cdot r_i \cdot \eta} E \quad \text{Gl. 1.3}$$

¹ Die in der Kapillarelektrophorese üblicherweise verwendeten Einheiten sind [kV] für die Spannung, [cm] für Angaben von Kapillarlängen und [min] für Migrationszeiten.

Die Wanderungsgeschwindigkeit ist also der elektrischen Feldstärke proportional, der Proportionalitätsfaktor μ_{ep} entspricht der elektrophoretischen Mobilität. Dabei ist deren Vorzeichen als auch das von v_{ep} von der Ladungsart abhängig. Die Mobilität μ_{ep} drückt die durchschnittliche elektrophoretische Geschwindigkeit eines geladenen Teilchens in Relation zur elektrischen Feldstärke aus:

$$\boldsymbol{m}_{ep} = \frac{v_{ep}}{E} \quad \text{Gl. 1.4}$$

Für ein gegebenes Teilchen hängt die elektrophoretische Mobilität praktisch nur von der Viskosität des Mediums ab. Diese ist von der Temperatur abhängig [6].

1.1.2 Elektroosmotische Mobilität

Neben der elektrophoretischen gibt es die elektroosmotische Mobilität. Diese entsteht durch Elektroosmose, auch elektroosmotischer bzw. endoosmotischer Fluß (EOF) genannt. Der EOF ist definiert als die Bewegung einer Flüssigkeit relativ zu einer fixierten Ladung, hervorgerufen durch Anlegen eines elektrischen Feldes. Er tritt immer dann auf, wenn ein Flüssigkeitssystem in engem Kontakt zu einer geladenen Oberfläche steht und eine Spannung angelegt wird [7]. Bei einer Kieselglaskapillare, wie sie in der CE meist benutzt werden, wird in Abhängigkeit vom pH-Wert eine geladene Oberfläche erzeugt: die Silanol-Gruppen an der Oberfläche des Kieselglases können neutral oder deprotoniert vorliegen. In den meisten Fällen wird bei der CZE (Kapillarzonenoelektrophorese, s. Kap. 1.2.1) ein $\text{pH} > 2$ gewählt [8], so daß der Großteil der Silanolgruppen deprotoniert vorliegt, d. h. es bildet sich eine negativ geladene Oberfläche aus. Ausgleichend lagern sich Kationen an die Silikatwand an. Da die Kationen im Vergleich zu den (festsitzenden) Silanolat-Gruppen einen größeren Radius besitzen, sind zum Ladungsausgleich mehrere Schichten von Ionen nötig. Die erste, festsitzende Doppelschicht (Helmholtz-Schicht) wird dabei nach Stern von einer diffusen Doppelschicht (Debye-Hückel-Schicht) überlagert. In der Debye-Hückel-Schicht ist Diffusion möglich.

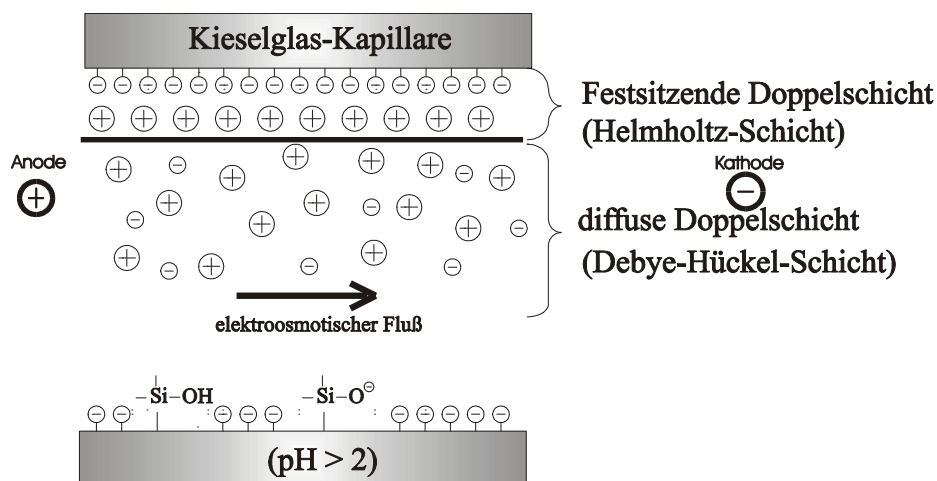


Abb. 1.2: Schematischer Aufbau der Doppelschichten und Entstehung des EOF (vgl. [5])

Beim Anlegen einer elektrischen Spannung bildet sich ein Fluß zur Kathode, der „EOF“ aus, der durch die größere Zahl an Kationen in der Außenschicht der Kapillare von der Kapillarwand ausgeht. Da die Kationen samt ihrer Hydrathüllen wandern, wird der gesamte Inhalt der englumigen Kapillare in Richtung Kathode bewegt.

Der EOF besitzt im Gegensatz zu einem durch Druck erzeugten Fluß, wie er z. B. bei der Flüssigchromatographie vorkommt, kein parabolisches, sondern ein annähernd stempelförmiges Strömungsprofil. Wegen dieses Strömungsprofils trägt in der CE nur die Diffusion zur Verbreiterung der Peaks bei.

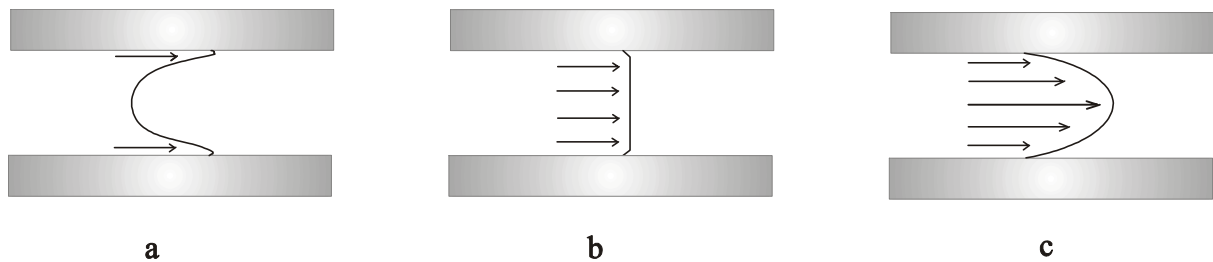


Abb. 1.3: Kurz nach Anlegen des elektrischen Feldes läßt der EOF ein invers parabolisches Strömungsprofil entstehen (a), welches nach kurzer Zeit ein stempelförmiges Strömungsprofil ergibt (b).

Zum Vergleich: Strömungsprofil in der HPLC (c) (vgl. [5])

Die Geschwindigkeit des EOF ist proportional der angelegten Feldstärke:

$$v_{EOF} = m_{EOF} \cdot E \quad \text{Gl. 1.5}$$

mit

$$m_{EOF} = \frac{z \cdot e}{4 \cdot p \cdot h} \quad \text{Gl. 1.6}$$

μ_{EOF} : Elektroosmotische Mobilität

ζ : Zeta-Potential [V]

ϵ : Dielektrizitätskonstante des Mediums [$\text{F} \cdot \text{m}^{-1}$]

η : Viskosität der Lösung [$\text{Pa} \cdot \text{s} = 10^3 \text{ cP}$]

Das ζ -Potential ist das Potential der diffusen Doppelschicht; es nimmt mit der Entfernung von der geladenen Oberfläche exponentiell ab und steigt mit abnehmender Ionenstärke der Lösung und mit zunehmendem pH-Wert an.

Eine Änderung des pH-Wertes zwischen 4 und 8 wirkt sich am stärksten auf den EOF aus [9].

Die Geschwindigkeit des EOF kann durch den Quotienten aus der effektiven Kapillarlänge und der Migrationszeit des EOF ausgedrückt werden:

$$v_{EOF} = \frac{l}{t_{EOF}} \quad \text{Gl. 1.7}$$

Die elektrische Feldstärke kann mit

$$E = \frac{U}{L} \quad \text{Gl. 1.8}$$

berechnet werden.

Durch Einsetzen in die Gleichung (1.5) kann die elektroosmotische Mobilität berechnet werden:

$$\mu_{EOF} = \frac{l \cdot L}{U \cdot t_{EOF}} = \frac{v_{EOF}}{E} \quad [\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}] \quad \text{Gl. 1.9}$$

- l: Effektive Länge der Kapillare bis zum Detektor [cm]
- L: Gesamtlänge der Kapillare [cm]
- t_{eo} : Migrationszeit des EOF [min]
- U: Angelegte Spannung [kV]

1.1.3 Bruttomobilität

Die meßbare Mobilität eines Teilchens, die sich aus der Summe der elektrophoretischen und der elektroosmotischen Mobilität zusammensetzt, wird als „Bruttomobilität“ bezeichnet und kann nach der Gleichung (1.10) berechnet werden:

$$\mathbf{m}_{br} = \frac{l \cdot L}{U \cdot t_M} = \mathbf{m}_{EOF} + \mathbf{m}_{ep} \quad [\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}] \quad \text{Gl. 1.10}$$

t_M : Migrationszeit des Teilchens [min]

Die elektrophoretische Mobilität wird auch als „Nettomobilität“ bezeichnet und läßt sich mit den Gleichungen (1.9) und (1.10) direkt aus den Elektropherogrammen ermitteln.

Wenn eine Substanz positiv geladen ist, so wandert sie schneller als der EOF, und das Vorzeichen der elektrophoretischen Mobilität ist positiv; bei ungeladenen Substanzen ist $\mu_{ep} = 0$, und negativ geladene Substanzen laufen langsamer als der EOF.

Ist bei einer negativ geladenen Substanz $\mu_{ep} > \mu_{EOF}$, so wandert diese wieder zur Injektionsseite heraus und wird nicht detektiert. Durch eine Vergrößerung des EOF (pH-Wert erhöhen) oder Umpolung des Systems kann das Problem behoben werden (s. auch Kap. 3).

1.1.4 Injektion

Wie unter 1.1 beschrieben, gibt es in der Kapillarelektrophorese prinzipiell zwei Injektionsarten:

die hydrodynamische und die elektrokinetische Injektion [9].

Diese werden hier kurz vorgestellt.

1.1.4.1 Hydrodynamische Injektion

Bei der hydrodynamischen Injektion gibt es drei denkbare Möglichkeiten.

Diese sind

- Injektion durch Anlegen eines Überdrucks am Injektionsgefäß (Unicam-Gerät, s. Kap. 10),
- Injektion durch Anlegen eines Unterdrucks am Auslaßgefäß (TSP-Gerät, s. Kap. 10) oder
- Injektion durch Anheben des Injektionsgefäßes (hydrostatisch), aus welchem injiziert werden soll.

Das injizierte Volumen V_h bei der hydrodynamischen Injektion beträgt:

$$V_h = \frac{\Delta p \cdot \rho \cdot r^4 \cdot t_{inj}}{8\eta \cdot L} \quad \text{Gl. 1.11}$$

V_h : Injektionsvolumen [$\text{m}^3 = 10^{12} \text{ nl}$]

Δp : Druckunterschied [Pa]

r : innerer Kapillarradius [m]

t_{inj} : Injektionszeit [s]

η : Viskosität der Lösung [$\text{Pa} \cdot \text{s} = 10^3 \text{ cP}$]

L : Gesamtlänge der Kapillare [m]

Bei hydrostatischer Injektion errechnet sich die Druckdifferenz Δp wie folgt:

$$\Delta p = \rho \cdot g \cdot \Delta h \quad \text{Gl. 1.12}$$

ρ : Dichte der injizierten Lösung [$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$]

g : Gravitationskraft [$9,80665 \text{ N} \cdot \text{kg}^{-1}$]

Δh : Höhenunterschied zwischen Injektions- und Auslaßgefäß [m]

1.1.4.2 Elektrokinetische Injektion

Bei der elektrokinetischen Injektion erfolgt das Aufbringen der Probe durch Anlegen von Spannung. Das injizierte Volumen und die injizierte Proben-(Substanz-)menge sind sowohl vom EOF als auch von der Mobilität der Probeionen abhängig.

Das Probevolumen errechnet sich nach

$$V_{el} = v_{EOF} \cdot \pi \cdot r^2 \cdot t_{inj} \quad \text{Gl. 1.13}$$

V_{el} : Injektionsvolumen [$\text{m}^3 = 10^{12} \text{ nl}$]

v_{EOF} : Geschwindigkeit des EOF [$\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$]

r : innerer Kapillarradius [m]

t_{inj} : Injektionszeit [s]

Die Probenmenge ergibt sich zu

$$n_i = \frac{(\mu_i + \mu_{EOF}) \cdot \pi \cdot r^2 \cdot U_{inj} \cdot c_i \cdot t_{inj}}{L} \quad \text{Gl. 1.14}$$

n_i : injizierte Probenmenge [mol]

μ_i : Mobilität der Probeionen [$\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]

μ_{EOF} : Mobilität des EOF [$\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]

U_{inj} : Injektionsspannung [V]

c_i : Konzentration der Probe [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]

Daher kann die injizierte Probenmenge sowohl durch die Injektionszeit als auch durch die Injektionsspannung beeinflusst werden. In Abhängigkeit von Mobilität und Ladungsvorzeichen der verschiedenen Probeionen kann eine elektrokinetische Injektion sehr erfolgreich sein, bei falscher Wahl der Parameter wird jedoch keine nennenswerte Substanzmenge injiziert werden. Versucht man z. B. im Falle eines zur Kathode gerichteten EOF eine Anionenspezies, die eine höhere Mobilität als dieser besitzt (allerdings in die Gegenrichtung) zu injizieren, so muß dies bei „normaler Polung“ (das Auslassende ist als Kathode geschaltet) scheitern. Einige spezielle Methoden, die auf elektrokinetischer Injektion beruhen, werden in den Kap. 1.2.5 und 6 beschrieben.

1.2 Methoden in der Kapillarelektrophorese

An dieser Stelle sollen die in der Kapillarelektrophorese verwendeten Methoden kurz aufgezeigt werden. Dabei liegt der Schwerpunkt auf den in dieser Arbeit angewandten Methoden Kapillarzonenlektrophorese (CZE), Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC), Trennung von Enantiomeren, Kapillarelektrophorese mit polymeren Trennmedien und Kapillarelektrophorese mit Probenfokussierung (Kap. 1.2.1 bis 1.2.5).

1.2.1 Kapillarzonenlektrophorese

In der Kapillarzonenlektrophorese (CZE) werden Substanzen aufgrund unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilitäten, hervorgerufen durch verschiedene Ladungsdichten, getrennt. Als Maß für die Trennung dient der Trennfaktor α , der als das Verhältnis der elektrophoretischen Mobilitäten zweier Substanzen definiert ist:

$$\alpha = \frac{m_{ep,2}}{m_{ep,1}} \quad \text{Gl. 1.15}$$

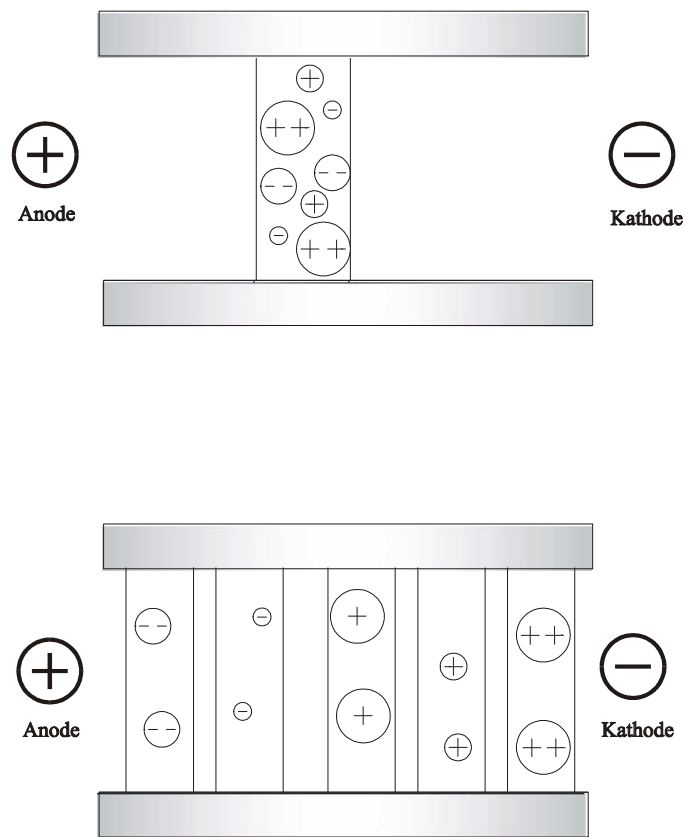


Abb. 1.4: Probenzone direkt nach der Injektion (a) und zu einem späteren Zeitpunkt (b). Es ist klar erkennbar, daß die Ionen aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladungsdichte getrennt werden (vgl. [5]).

Wenn der EOF zur Kathode gerichtet ist ($\text{pH} > 2$), wandern die Kationen am schnellsten und die Anionen am langsamsten², wobei die Geschwindigkeit von der Ladungsdichte der jeweiligen Substanz abhängt. Neutralteilchen wandern immer mit dem EOF und können nicht getrennt werden.

² Sofern der EOF größer ist als deren Nettomobilität.

1.2.2 Kapillarelektrophorese unter Zusatz polymerer Hilfsstoffe

Polymere wenig unterschiedlicher Kettenlänge besitzen ähnliche Masse/Ladungs-Verhältnisse. Aus diesem Grund ist es schwierig, sie allein durch das elektrophoretische Trennprinzip aufzutrennen, welches auf unterschiedlichen Mobilitäten beruht, die ihrerseits durch die Masse/Ladungs-Verhältnisse begründet sind. Ein Lösungsansatz ist die Verwendung von Hilfsstoffen, welche wie ein Sieb wirken. Dadurch entsteht ein zusätzliches Trennprinzip, so daß die Moleküle auch nach ihrer Größe getrennt werden. Zum Einsatz kommen dabei u. a. Polymere wie Polyethylenglykol (PEG) oder Agarose. Die theoretischen Modelle, welche die Trennmechanismen bei der Verwendung von Polymerzusätzen beschreiben, sollen nachfolgend kurz erläutert werden.

1.2.2.1 Modelle für Trennmechanismen [3, 10-14]

1.2.2.1.1 Das Ogston- bzw. Siebmodell

Man stellt sich die Polymermoleküle als undeformierbare, sphärische Körper vor, die durch die Maschen eines Netzwerkes aus starren Fasern wandern und je nach Größe mehr oder weniger zurückgehalten werden (Abb. 1.5).

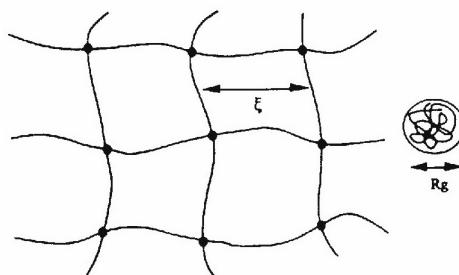


Abb. 1.5: Ogston- (Sieb-) Modell [10]

Kleinere Moleküle sollten also theoretisch schneller wandern als größere, da sie durch einen größeren Teil der vorhandenen Maschen passen. Dies kann mathematisch wie folgt ausgedrückt werden:

$$m = m_0 e^{-cb(R_g + r^2)} \quad \text{Gl. 1.16}$$

bzw.

$$m = m_0 e^{-\frac{1}{4} P \left(\frac{R_g + r}{x} \right)^2} \quad \text{Gl. 1.17}$$

b: Konstante

c: Konzentration des Polymernetzwerkes

μ : elektrophoretische Mobilität

μ_0 : elektrophoretische Mobilität in freier Lösung

r: Dicke eines Stranges

R_g : Radius des Probenmoleküls

ξ : Durchmesser der Maschen

Dieses Modell ist jedoch nur gültig für $E \rightarrow 0$, da es Einflüsse des elektrischen Feldes auf den Radius des Probenmoleküls nicht berücksichtigt. Wenn die oben erwähnten Bedingungen für die Gültigkeit des Modells erfüllt sind und der Radius des Probenmoleküls viel größer als der Radius der Netzwerkstränge ist, ergibt die Auftragung nach Ferguson, $\log(\mu/\mu_0)$ gegen c, eine Gerade mit einer Steigung proportional zu R_g^2 . Ist nun aber der Radius des Probenmoleküls größer als der Durchmesser der Maschen des Netzwerks, verliert das Modell seine Gültigkeit. Da es Fälle gibt, in denen sich Moleküle wie z. B. DNA, die einen wesentlich größeren theoretischen Molekülradius besitzen als der Durchmesser der Maschen, muß für diese Fälle nach einem anderen Modell gesucht werden.

1.2.2.1.2 Das Reptations-Modell

Da man beim Ogston-Modell von undeformierbaren Teilchen mit einem bestimmten Radius ausgeht, kann, wie oben erläutert, dieses Modell nur dann gültig sein, wenn die Maschen des Polymernetzes größer sind als die Molekül-„Kugeln“ des Analyten. Sind die „Kugeln“ aber größer als die Maschen, würden sie theoretisch steckenbleiben. Für diesen Fall wurde das Reptationsmodell eingeführt. Man geht nach wie vor davon aus, daß die Netzwerkstränge nicht durchdrungen werden können und feste Hindernisse bilden. Das Probenmolekül wird allerdings nicht mehr als sphärischer Körper, sondern als eine lineare Kette betrachtet, die sich in einer wurmähnlichen Bewegung bzw. wie eine aufgerollte Spirale durch das Netzwerk bewegen kann (Abb. 1.6).

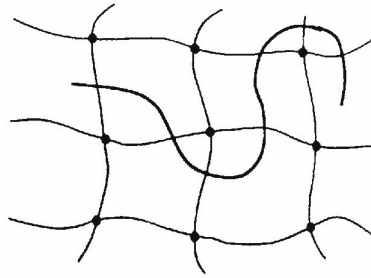


Abb. 1.6: Reptations-Modell [10]

Diese Art der Bewegung wird „Reptation“ genannt. Bei diesem Modell gilt, ebenfalls unter der Annahme, daß das elektrische Feld sehr klein ist:

$$\mu \approx \frac{1}{N} \quad \text{Gl. 1.18}$$

N: Zahl der Monomereinheiten des Probenmoleküls

Nach dieser Gleichung müßte die elektrophoretische Mobilität zur Molekülgröße indirekt proportional sein. Für höhere Feldstärken wurde das Reptations-Modell mit Überdehnung eingeführt.

Im Kriechmodell wird angenommen, daß die Polymerkette eine wurmähnliche Bewegung hat und sich durch ein imaginäres „Rohr“ bewegt. Allerdings wird beobachtet, daß die Mobilität der Polymere bis zu einer bestimmten Kettenlänge ab-, dann aber wieder zunimmt. Dies rührt wahrscheinlich daher, daß Moleküle bis zu einer bestimmten Größe eine U-förmige Konformation annehmen können, während dies bei noch größerer Kettenlänge unwahrscheinlich wird.

1.2.2.1.3 Reptations-Modell mit Überdehnung

Bei höheren Feldstärken kann man sich das Probenmolekül völlig aufgerollt, wie einen Stab, vorstellen (Abb. 1.7).

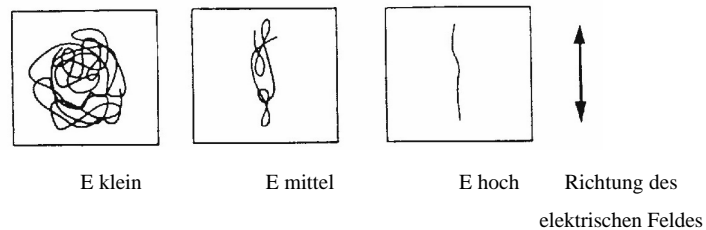


Abb. 1.7: Effekt der elektrischen Feldstärke auf ein wanderndes Molekül [10]

Im Extremfall ist die Mobilität eines Moleküls nicht mehr länger abhängig von seiner Größe. Dies wurde von Lumpkin [15] so zum Ausdruck gebracht:

$$\mu \approx K \left(\frac{1}{N} + bE^2 \right) \quad \text{Gl. 1.19}$$

b: Funktion von ξ , Ladung und Lebensdauer der wandernden Lösung

K: Konstante

Aus dieser Gleichung ist ersichtlich, daß die Abhängigkeit der Mobilität von der Molekülgröße mit zunehmendem elektrischen Feld oder mit zunehmender Molekülgröße abnimmt. Dies erklärt, weswegen, wie unter 1.2.4.1 erwähnt, auch so große Moleküle wie DNA-Stränge mit bis zu 20.000 Basenpaaren getrennt werden können.

1.2.2.2 CE mit Polymerlösungen

Bis hierhin wurden nur Unterschiede im Bezug auf das Probenmolekül betrachtet. Da in der CE aber keine Notwendigkeit zum Einsatz antikonvektiver Medien wie in der Flachbett-Gelelektrophorese besteht, können auch Konzentrationen verwendet werden, bei denen sich noch kein Netzwerk ausbildet. Dazu wurde von De Gennes der Begriff des „Überlappsschwellenwertes Φ^* “ eingeführt [16]. Bei Polymerlösungen wird zwischen verdünnten und halbverdünnten Lösungen unterschieden. Dabei gibt es eine Konzentration, ab der die Polymermoleküle beginnen, sich zu überlappen: Hier vollzieht sich der Übergang von einer verdünnten zu einer halbverdünnten Lösung. Diese Konzentration ist die Überlappsschwellenwert-Konzentration (Abb. 1.8).

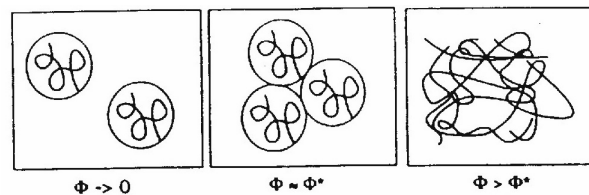


Abb. 1.8: Übergang von einer verdünnten zu einer halbverdünnten Lösung [8]

Die oben erwähnten Modelle (Reptation und Ogston) sind für diesen Fall nicht anwendbar. Es wird vermutet, daß das Probenmolekül eine vorübergehende Wechselwirkung („Verhaken“) mit dem zugesetzten Polymer eingeht. Die Wahrscheinlichkeit dafür steigt mit der Kettenlänge des Analyten, so daß auch hier eine Auftrennung nach Molekülgröße erfolgt.

Aus den hier vorgestellten Modellen und deren Vergleich mit experimentellen Ergebnissen folgen einige Gesetzmäßigkeiten für die CE mit Polymerzusatz:

- Eine kleinere Kettenlänge des zugesetzten Polymers führt zu einem dichteren Netzwerk, d. h. zu einer kleineren Porengröße [17, 18].
- Die Verwendung eines linearen Polymers hat eine kleinere korrigierte elektrophoretische Mobilität des Analyten zur Folge, d. h., es bildet bei gleicher Viskosität ein dichteres Maschenwerk aus als ein verzweigtes Polymer. Die Unterschiede werden bei größerer molarer Masse der Polymere kleiner [17].
- Bei einer höheren Temperatur ist der Überlappschwellwert geringer, da der Kreiselradius der Polymermoleküle größer ist, was zu einer höheren Wahrscheinlichkeit der Überlappung führt.
- Dies gilt allerdings nur für wässrige Lösungen. Bei Zusatz von z. B. Methanol ist die Solvation der Polymermoleküle stark temperaturabhängig, und der oben beschriebene Effekt kehrt sich um.

Als ein drittes Theorem gibt es das Modell der entropischen Barrieren, welches auch als Modell der „Hohlräume und Flaschenhälse“ bzw. der „Seen“ bezeichnet wird [19]. Bei den zugrunde gelegten Annahmen wird das Innere der Kapillare als eine Kette offener Flächen, sogenannten „Seen“, die durch Engstellen („Flaschenhälse“) miteinander verbunden sind, betrachtet.

1.2.3 Mizellare Elektrokinetische Chromatographie

Die Mizellare Elektrokinetische Chromatographie (MEKC) ist eine Mischform aus Elektrophorese und Chromatographie und gehört zur Gruppe der Verfahren der Elektrokinetischen Chromatographie, zu denen auch die Cyclodextrin-EKC, die Ionenaustausch-EKC und die Mikroemulsions-EKC gehören.

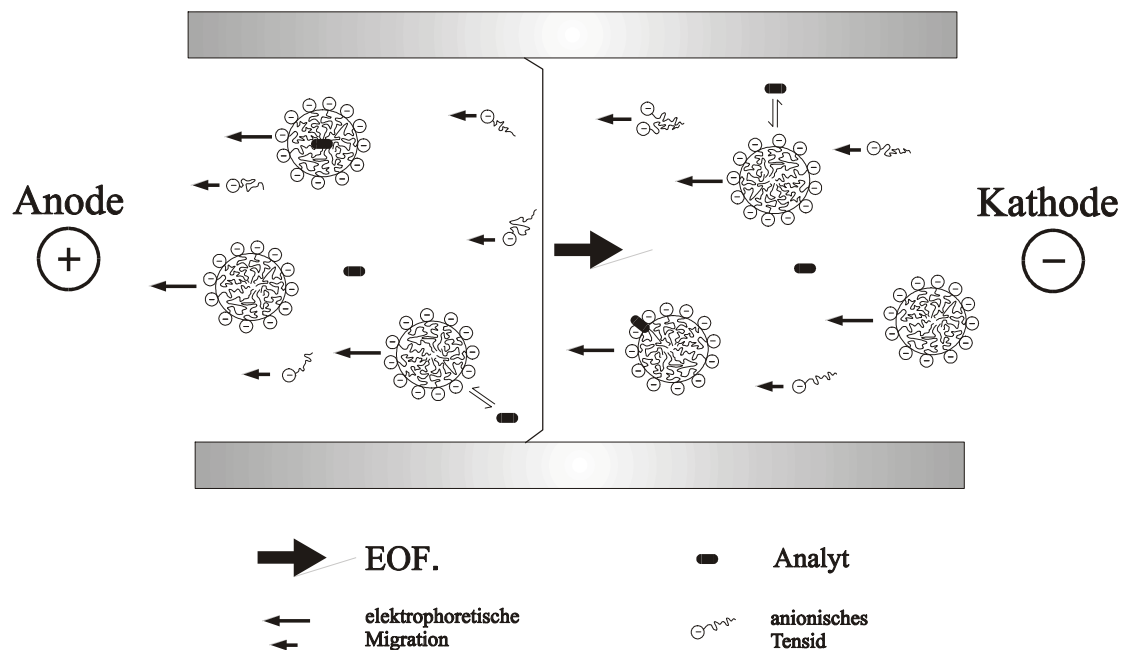


Abb. 1.9: In der MEKC werden Teilchen durch unterschiedliche Wechselwirkung mit den Mizellen getrennt (vgl. [5])

Mit dieser Trenntechnik, die Terabe 1984 einfuhrte [20], wird es möglich, neben geladenen auch neutrale Teilchen zu trennen. Durch Zusatz einer oberflächenaktiven Substanz zur Pufferlösung wird eine pseudostationäre Phase erzeugt, die der stationären Phase in der Chromatographie entspricht. Diese ist jedoch in der CE homogen in der mobilen Phase verteilt und wandert mit einer vom EOF verschiedenen Geschwindigkeit. Ein neutraler Analyt verteilt sich, je nach seiner Lipophilie, zwischen den zwei Phasen. Die Analyten werden also aufgrund verschiedener Verteilungskoeffizienten getrennt.

Das Molverhältnis zwischen der pseudostationären und der mobilen wäßrigen Phase wird als Kapazitätsfaktor k bezeichnet:

$$k = \frac{(t_S - t_{EOF})}{t_{EOF} \cdot \left(1 - \frac{t_S}{t_M}\right)} = K \cdot \left(\frac{V_p}{V_m}\right) \quad \text{Gl. 1.20}$$

- K : Gleichgewichtskonstante
 t_{EOF} : Migrationszeit des EOF [min]
 t_M : Migrationszeit der Mizellen [min]
 t_S : Migrationszeit der Substanz [min]
 V_m : Volumen der mobilen Phase
 V_p : Volumen der pseudostationären Phase

Sehr polare, neutrale Substanzen wie Dimethylformamid (DMF) und Methanol wandern mit dem EOF. Nach der Gleichung 1.12 ist ihr Kapazitätsfaktor $k = 0$. Stark lipophile Substanzen wie z. B. Sudan III wandern mit den Mizellen und können als Mizellmarker verwendet werden. Ihr Kapazitätsfaktor ist unendlich groß. Das Zeit- oder Migrationsfenster in der MEKC ist der Bereich zwischen dem EOF und den Mizellen, dessen Breite sich aus dem Verhältnis der Migrationszeiten des EOF und der Mizellen ergibt. Die Auflösung zweier Substanzen in der MEKC kann nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$R = \left(\frac{\sqrt{N}}{4}\right) \cdot \left(\frac{a-1}{a}\right) \cdot \left(\frac{k_2}{k_2+1}\right) \cdot \left(\frac{1 - \frac{t_{EOF}}{t_M}}{1 - k_1 \cdot \frac{t_{EOF}}{t_M}}\right) \quad \text{Gl. 1.21}$$

mit

$$a = \frac{k_2}{k_1} \quad \text{Gl. 1.22}$$

- α : Trennfaktor
 N : Trennbodenzahl

1.2.4 Chirale Trennungen

Bei bestimmten chiralen Substanzen, vor allem, wenn sie für die Anwendung als Arzneistoff in Frage kommen, kann es überaus wichtig sein, sie enantiomerenrein herzustellen. Daraus ergibt sich unweigerlich die Fragestellung einer enantiomerenspezifischen Analysen-methode, um die Enantiomerenreinheit dieses Arzneistoffes zu überprüfen. Eine schnelle und sichere Methode besteht in der Kapillarelektrophorese, welche zu diesem Zweck unter Zusatz entsprechender Selektoren durchgeführt wird. Hierbei werden meist geeignete Cyclodextrine verwendet.

1.2.4.1 Saure und basische Substanzen

Für erste Vorversuche können die entsprechenden Enantiomerengemische mit einem Phosphatpuffer (pH = 2,5) für basische bzw. mit einem Acetatpuffer (pH = 5 - 8) für saure Substanzen, denen 10 mmol/l Cyclodextrin zugesetzt sind, vermessen werden [21].³ Zuerst wird versucht, mit β -Cyclodextrin eine Trennung zu erreichen. Bei Bedarf (starke Wechselwirkung des Analyten mit dem Selektor) kann die Konzentration des Selektors erniedrigt bzw. die Affinität zum Selektor durch Zusatz von Methanol, Cyclohexanol, SDS, Harnstoff [21], anderen organischen Zusätzen und pH-Änderungen gesenkt werden. Wenn dies nicht den gewünschten Erfolg bringt, können derivatisierte Cyclodextrine wie z.B. Heptakis-(2-hydroxypropyl)- oder Heptakis(2,6-di-O-methyl)-Cyclodextrin (10 mM) verwendet werden. Bei Naphthalin und größeren Analyten ist die Verwendung von γ -Cyclodextrin (15 mM) ratsam, während bei kleineren (kleiner als ein aromatisches System), lipophilen Analyten zunächst α -Cyclodextrin (15 mM) verwendet wird. Auch der Einsatz des jeweils anderen Cyclodextrins bzw. seiner Derivate ist eine weitere Möglichkeit, eine erfolgreiche Trennung zu erreichen.

³ Puffer für pH = 2,5: 205,3 mg 85% H_3PO_4 / 574,3 mg KH_2PO_4
Puffer für pH = 5: 2,13 ml 1 M CH_3COOH / 317,6 mg CH_3COONa
(für je 100 ml 60 mM Puffer)

1.2.4.2 Neutrale Substanzen

Bei neutralen Substanzen kann ein pH zwischen 2 und 8 verwendet werden. Da bei Einsatz der unter 1.2.4.1 verwendeten, ungeladenen Cyclodextrine keine Trennung erfolgen würde (sowohl die entsprechende Substanz als auch das Cyclodextrin würden mit dem EOF wandern), sind hier geladene Cyclodextrine erforderlich. Diese werden in einer Konzentration von ≤ 5 mM verwendet. Sie sollten vollständig geladen sein, d. h. der pH-Wert der Pufferlösung sollte mindestens zwei Einheiten über oder unter dem pK_s -Wert des jeweiligen Cyclodextrins liegen. Bei primären Aminen ist die Verwendung einer 18-Krone-6-Ether-Tetracarbonsäure in Erwägung zu ziehen.

1.2.4.3 Methodenoptimierung

Sobald eine ausreichende Trennung erzielt wird, ist es sinnvoll, die anderen Parameter zu optimieren. Dabei wird R' , ein für chirale Trennungen modifizierter Auflösungsfaktor⁴, zur Beurteilung herangezogen:

$$R' = 100 \frac{H - H'}{H} \quad \text{Gl. 1.23}$$

H: Peakhöhe des ersten Peaks

H': Höhe des Tales zwischen dem ersten und dem zweiten Peak

$R'=100$: vollständige Auftrennung der Enantiomeren

Ist R' größer oder gleich 50, kann man davon ausgehen, daß die Methode durch geeignete Schritte zu einer besseren Auflösung führen wird.

Zunächst wird die Konzentration des chiralen Selektors optimiert.

⁴ In der HPLC ist die Auflösung R wie folgt definiert:

$$R = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_1 + w_2} = 1,18 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_1^{0,5} + w_2^{0,5}}$$

t_{Ri} : Retentionszeit des Peaks i

$w_i^{0,5}$: Peakbreite auf halber Höhe des Peaks i

Dazu wird, falls es bekannt ist, das Reziproke der Bindungskonstante verwendet. Wenn die höchste getestete Konzentration die beste sein sollte, kann die Löslichkeit mit organischen Lösungsmitteln weiter erhöht werden. Werden dagegen bei niedrigen Konzentrationen die besten Ergebnisse erhalten, ist eine starke Wechselwirkung zwischen dem Analyten und dem Selektor wahrscheinlich. Diese Wechselwirkungen können durch Zusätze wie Methanol, SDS, Cyclohexanol oder Harnstoff abgeschwächt werden. Zuletzt wird der pH-Wert optimiert.

Weitere Möglichkeiten der Optimierung sind der Zusatz oberflächenaktiver Substanzen (Cyclodextrin-MEKC, vgl. Kap. 1.2.3), die Verwendung anderer chiraler Selektoren (makrozyklische Antibiotika, Proteine, Polysaccharide, chirale oberflächenaktive Substanzen, chirale Ionenpaar-Reagenzien, ...) sowie der Zusatz von Borat zu einem Cyclodextrin-Puffer. Auch können nicht-wässrige Medien verwendet werden.

1.2.5 Kapillarelektrophorese mit Probenfokussierung

Bei der Kapillarelektrophorese ist der Lichtweg bei der UV/Vis-Detektion sehr kurz (die normalerweise verwendeten Kieselglaskapillaren haben einen Innendurchmesser in der Größenordnung von 50 μm) [1-3]. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, diesen Nachteil auszugleichen. Auf der einen Seite können andere Detektionsmethoden herangezogen werden. Versucht werden kann z. B., den Lichtweg durch Verwendung besonderer Kapillaren zu verlängern. Dazu gehören u. a. die Kapillaren mit Z-Zelle [22] oder erweiterter Kapillarküvette [23] sowie Kapillaren mit rechtwinkliger Geometrie.

Wie bei anderen Analysenverfahren können die Proben auch für die CE z. B. durch Festphasenextraktion angereichert werden. Hier soll auf die Aufkonzentrierung der Proben während der eigentlichen Kapillarelektrophorese bzw. während des Injektionsvorgangs eingegangen werden. Das Prinzip der Fokussierung (Aufkonzentrierung) während der Kapillarelektrophorese beruht auf der unterschiedlichen Feldstärke bei unterschiedlichen Ionenkonzentrationen gemäß dem modifizierten Ohmschen Gesetz [24].

$$E\sigma = j \text{ [Am}^{-2}\text{]}$$

Gl. 1.24

E: Elektr. Feldstärke

σ : Spezif. Zonenleitfähigkeit

j: Stromstärkedichte

Daraus folgt, daß bei höherer Zonenleitfähigkeit die Feldstärke niedriger ist und umgekehrt. Die Probe wird also in einer Lösung mit niedriger Leitfähigkeit gelöst (im einfachsten Fall wird eine wäßrige Lösung verwendet). Gemäß der Gleichung 1.4 ist dann die Wanderungsgeschwindigkeit bei einer gegebenen Mobilität der elektrischen Feldstärke direkt proportional, d. h., daß die (geladenen) Probeteilchen bis zur Grenzfläche niedrig konzentrierte Probelösung / hoch konzentrierter Puffer mit einer relativ hohen Geschwindigkeit wandern und dort aufkonzentriert werden. In der Abb. 1.10 soll dies dargestellt werden.

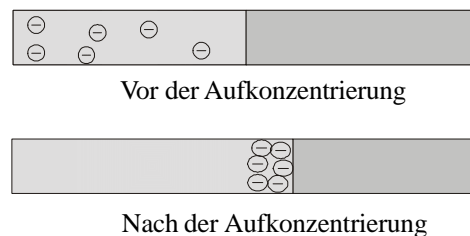


Abb. 1.10: Aufkonzentrierung von Anionen

Eine andere Funktion, welche die Vorgänge während der Durchführung einer kapillarelektrophoretischen Trennung beschreibt, ist die Regulierungsfunktion von Kohlrausch [25]:

$$w = \sum_i \frac{c_i}{|\mu_i|} \quad 1.25$$

c_i : Konzentration

μ_i : Mobilität der beteiligten Ionen

1.2.6 Indirekte Detektion

Besitzt ein Probemolekül bei der angewandten Detektionsmethode keine eigene Absorption, gibt es die Möglichkeit der indirekten Detektion, d. h., man erhält nicht dadurch einen Peak, daß die Substanz selbst absorbieren würde, sondern dadurch, daß Moleküle des absorbierenden Hintergrundelektrolyten vor allem durch elektrostatische Effekte verdrängt werden und so eine „negative“ Absorption erzeugen [9, 26, 27].

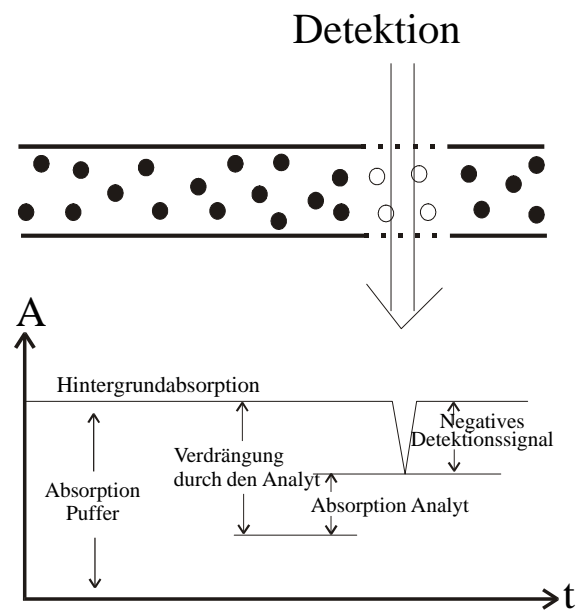


Abb. 1.11: Prinzip der indirekten Detektion (vgl. [28])

Der Nachteil dieser Methode muß darin gesehen werden, daß die Selektivität (z. B. Wellenlängenselektivität bei UV-Detektion) völlig verloren geht. Das bedeutet, daß im Gegensatz zur direkten Detektion alle Verunreinigungen, die in der Probe enthalten sind, zu Peaks führen. Auch kann durch eine zu hohe Spannung vermehrtes Rauschen hervorgerufen werden [29]. Ein Erkennen des gesuchten Ions aufgrund seiner spektralen Eigenschaften ist hier naturgemäß ausgeschlossen.

1.2.7 Andere Methoden

Neben den in dieser Arbeit angewandten Methoden gibt es für spezielle Problemstellungen entsprechende Lösungsansätze. Dazu gehören die Kapillarisotachophorese (CITP), die Kapillarisoelektrophorese (CIEP) und die Elektrochromatographie (EC). Letztere steht der HPLC wesentlich näher als der CE. Gute Beschreibungen dieser Verfahren werden in [1, 2, 9] angeboten.

2 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, umfassende Erkenntnisse auf dem Gebiet der Methodenentwicklung in der Kapillarelektrophorese zu gewinnen. Dazu wurden die im folgenden aufgeführten Methoden zur Auftrennung von Polymeren, zum Nachweis von Verunreinigungen und zur Probenaufkonzentrierung im Detail untersucht.

- Die Arbeiten zur Auftrennung von Polymeren sahen vor, anhand von ausgewählten Beispielen die Besonderheiten bei der Methodenentwicklung für solche Trennungen herauszustellen.
- Im Rahmen des Nachweises von Verunreinigungen sollte exemplarisch für das Chemotherapeutikum Taurolidin eine Methode entwickelt werden, die es ermöglicht, synthesebedingte Verunreinigungen zu detektieren.
- Diesem Kapitel schließt sich ein weiterer Abschnitt an, welcher sich mit dem Nachweis von enantiomeren Verunreinigungen befaßt.
- Während der Methodenentwicklung besteht oftmals die Notwendigkeit, die Nachweisgrenze durch Erhöhung der Empfindlichkeit herabzusetzen. Daher sollen anhand verschiedenartiger Modellsubstanzen Möglichkeiten zur Probenaufkonzentrierung durchgeführt werden, um auch auf diesem Gebiet allgemeine Erkenntnisse zu gewinnen.
- Die bei der Kapillarelektrophorese auftretenden Fehlerquellen sollen anschließend gesammelt und in einer Übersicht dargestellt werden.

3 Trennung von Polymeren

3.1 Vorstellung der untersuchten Polymere

In diesem Kapitel werden die Polymergemische Chondroitinsulfat, Heparin, Pentosanpolysulfat, PA (Polymergemisch mit einem Acryl-Polymer) und Polygalacturonsäure untersucht. Folgende Tabelle gibt einen Überblick über Molmassen und Bezugsquellen:

Polymer	M [g/mol]	CAS-Nr.	Gef.	Lieferant
Chondroitinsulfat A Natriumsalz	k. A.	[9082-07-9]	-	Fluka
Heparin Natriumsalz	4.000 – 6.000	[9041-08-1]	-	Fluka
Pentosanpolysulfat	≈ 5.000	k. A.	-	Bene ¹
PA (Polymergemisch mit einem Acryl-Polymer)	≈ 5.000	k. A.	☒	
Polygalacturonsäure	25.000 – 50.000	[25990-10-7]	-	Fluka

Tab. 3.1: Übersicht über die verwendeten Polymere [30, 31]

Es wird versucht, mittels Kapillarelektrophorese eine Auftrennung der aufgeführten Polymere nach deren Kettenlänge zu erreichen. Zu diesem Zweck muß ein geeigneter Puffer gefunden werden. Da die Analyten nicht über Chromophore verfügen und daher selbst keine Absorption im UV-Bereich aufweisen, muß auf die indirekte Detektion zurückgegriffen werden. In der Dissertation von M. Degenhardt [28] wird ein Puffer beschrieben, der sich für Pentosanpolysulfat (ein polysulfatierter Polyzucker) als geeignet erweist. Aufbauend auf diese Methode wird nun versucht, den Ansatz zu generalisieren. Ausgegangen wird von einem

¹ Bene Arzneimittel GmbH, München

Puffer, bestehend aus 1,2,4-Benzol-Tricarbonsäure (BTC, Trimellitsäure)². Durch Modifizierungen soll die Auftrennung der anderen Polymergemische (Tab. 3.1) erreicht werden. Als Modellsubstanz soll die bereits gut beschriebene Substanz Pentosanpolysulfat verwendet werden, wobei versucht wird, die Trennungen durch Zusatz anderer Polymere zum Laufpuffer zu verbessern (s. Kap. 1.2.2). Danach sollen die Polysaccharid-Derivate Chondroitinsulfat, Heparin und Polygalacturonsäure behandelt werden, dann die beiden Acryl-Polymere (Kap. 3.4 bis 3.6). Die verwendete Methode wird unter Experimentelles genauer beschrieben (Kap. 3.7). An dieser Stelle sollen zunächst einige literaturbekannte Methoden zur Trennung von Polyacrylsäure, die hier ebenfalls als Modellsubstanz dient, vorgestellt werden.

3.2 Bestimmung der relativen molaren Masse von Polyacrylsäuren

3.2.1 Allgemeines

Acrylsäure reagiert spontan und exotherm zu Polyacrylsäure.

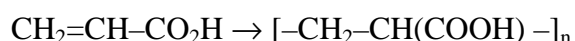


Abb. 3.1: Polymerisation von Acrylsäure [33]

Vorsichtig getrocknet, lösen sich die Polysäuren selbst bei hohen Molekularmassen sehr gut in Wasser, sowie in Dioxan, Dimethylformamid und niederen Alkoholen. Sie werden nicht von Aceton, Ether, Kohlenwasserstoffen und den eigenen Monomeren gelöst. Von den Salzen sind die Alkali- und die Ammoniumsalze löslich, während die Salze mehrwertiger Kationen in Wasser leicht quellbare Gele bilden [34].

² Mit NaOH auf pH = 4,9 eingestellt, s. Kap. 10.3

3.2.2 HPLC-Methode

Für mono- bis hepta-Acrylsäuren ist in der Literatur bereits eine HPLC-Methode beschrieben. Mit einer C18-Säule (Umkehrphase, Teilchengröße 7 μm , Außenmaße 250 \times 4,6 mm), mobile Phase Acetonitril:Wasser:H₃PO₄ (25:74:1), Flußrate 1,0 ml/min, λ = 214 nm, konnten die Säuren getrennt werden (Abb. 3.2) [35].

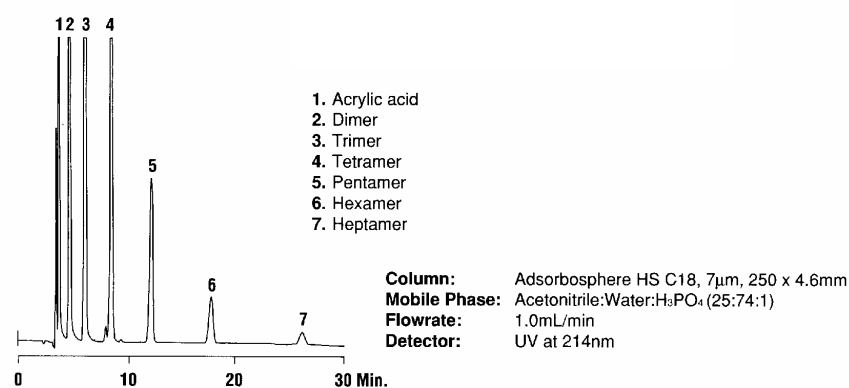


Abb. 3.2: HPLC-Methode zur Trennung von mono- bis hepta-Acrylsäure (aus [35])

Bei genauerer Betrachtung der Methode und des Chromatogramms erkennt man aber die Nachteile dieser Methode: der Bedarf an Fließmittel, welches zu 25 % Acetonitril enthält, ist mit 1 ml/min relativ hoch, und schon beim Heptamer wird eine Analysenzeit von annähernd 30 Minuten erreicht, so daß diese Methode für Polyacrylsäure ungeeignet ist.

3.2.3 CE-Methode

Gesättigte und ungesättigte Mono- und Dicarbonsäuren konnten bei 185 nm unter Zusatz von 1,5-Dimethyl-1,5-diazaundecamethylen-polymethobromid (Hexadimethrinbromid; HDB; Polybren, [9011-04-5] oder [28728-55-4], Abb. 3.3) sowohl bei direkter als auch bei indirekter Detektion im Bereich von wenigen Minuten getrennt werden [36].

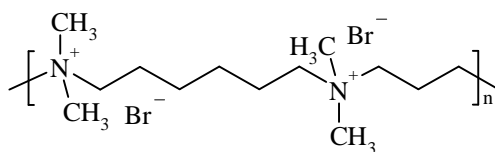


Abb. 3.3: HDB

Dabei werden durch HDB co-elektroosmotische Bedingungen erreicht: die HDB-Moleküle lagern sich an die negativ geladene Kapillarwand an, und durch die positive Ladung der Stickstoff-Atome ist die Kapillarwand positiv geladen. An diese positiv geladene Kapillarwand lagern sich negativ geladene Ionen aus der Pufferlösung an. Nach dem gleichen Prinzip wie in Kap. 1.1.2 entsteht nun ein EOF, welcher jetzt zur Anode gerichtet ist, so daß anionische Analyten schneller am Detektor ankommen als kationische, was zu der oben erwähnten kurzen Analysenzeit für die unter diesen Bedingungen als Anionen vorliegenden Analyten führt. Wie bei der oben beschriebenen HPLC-Methode ist aber auch diese Methode nicht zur Trennung längerkettiger Polymere geeignet.

3.2.4 Möglichkeiten zur Trennung von Polyacrylsäuren verschiedener Kettenlänge

In den unter 3.2.2 und 3.2.3 beschriebenen Methoden handelt es sich um Trennungen von Oligomeren bis $n = 7$. Mit einem basischen Laufpuffer sollte es möglich sein, Polyacrylationen zu trennen (gegebenenfalls mit indirekter Detektion, als Hintergrundelektrolyt wäre z. B. die bei indirekter Detektion oft verwendete Sorbinsäure denkbar, vgl. Kap. 1.2.6). Die Bestimmung der Molmasse würde dann durch Vergleich mit Standards definierter Kettenlänge erfolgen. Ist dies nicht möglich, kann versucht werden, die Trennung durch Zusatz einer oberflächenaktiven Substanz zur Erhöhung der Selektivität (z. B. SDS, vgl. Kap. 1.2.3), zu ermöglichen. Eine weitere denkbare Möglichkeit wäre der Einsatz anderer Polymere, die als Molekularsieb wirken können, als Pufferzusatz (vgl. Kap. 1.2.2), oder der Einsatz der Kapillargelelektrophorese [11, 12, 37, 38].

3.2.5 Vorstellung zweier CE-Methoden

Für die Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen gibt es bereits CE-Methoden. In folgender Methode kommt die Kapillar-Gelelektrophorese zum Einsatz [39]: Durch eine Grignard-Reaktion werden Vinylgruppen an den Silanolgruppen der Kapillarinnenwand eingeführt, die dann wieder mit Acrylamid reagieren. Dadurch kann ein Siebmedium von linearem Polyacrylamid erzeugt werden, welches durch hydrolytisch stabile Si–C-Bindungen an die Kapillarwand gebunden ist. Eine Mischung von Standardproteinen wird in einer

Pufferlösung aus Tris, Glycin, SDS und 2-Mercaptoethanol (pH = 8,7) gelöst. Der Laufpuffer enthält jeweils mehr Tris und Glycin, und sowohl die elektrokinetische Injektion als auch der Lauf selbst werden bei umgekehrter Polung (Einlaß: Kathode) durchgeführt. Die Detektion erfolgt bei $\lambda = 280 \text{ nm}$.

In einer zweiten Veröffentlichung [40] werden Umkehrphasen-Gelelektrophorese (rPCGE), Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und HPSEC-Systeme (Größenausschlußchromatographie) miteinander verglichen. Während die Molekulargewichts-Werte der ersten beiden Verfahren gut übereinstimmen (auch mit den theoretisch für die entsprechenden Proteine errechneten Werten), ist das letztgenannte Verfahren am wenigsten zuverlässig. Mit Hinsicht auf eine kurze Analysenzeit und eine hohe Präzision der Bestimmung der Molekularmassen von Proteinen bieten die rPCGE-Systeme zwar beträchtliche Vorteile gegenüber der SDS-PAGE und der HPSEC, verursachen aber hohe Kosten. Deswegen wurde versucht, ein Verfahren zu finden, mit dem es auch möglich ist, mittels FZCE eine Trennung nach Molekülmassen durchzuführen.

3.3 Trennungen ohne Zusatz von Polymeren

Zunächst mußte eine geeignete Pufferkonzentration gefunden werden. Bei einem Vergleich von 12 mM mit 6 mM BTC-Puffer (pH jeweils pH 4,9) stellte sich der höher konzentrierte Puffer als der besser geeignete heraus (vgl. Abb. 3.9 und 3.10 und Kap. 1.2.6). Dies entspricht den Erwartungen, da bei einem höher konzentrierten Hintergrundelektrolyten entsprechend mehr absorbierende Moleküle verdrängt werden, so daß ein größeres negatives Signal erhalten wird (s. Kap. 1.2.6, Abb. 1.11), welches mit der entsprechenden Software (z. B. KISS [32]) in ein positives Signal umgewandelt und ausgewertet werden kann. Bei den durchgeführten Läufen gab es jedoch Probleme mit dieser hohen Konzentration. Deswegen wurde später ein 10 mM BTC-Puffer verwendet (s. Abb. 3.4). Es wurden auch Versuche mit einem 17,5 mM Puffer gemacht; dieser wurde mit je 3,3 / 6,6 / 10 / 13,2 / 16,5 % (V/V) Isopropanol versetzt. Dabei wurde bei der niedrigsten Konzentration eine leichte Verbesserung der Auftrennung gegenüber dem Puffer ohne Isopropanol-Zusatz (gute Trennung) erreicht; ab 10 % werden die Trennungen jedoch unbrauchbar.

3.4 Pentosanpolysulfat

Bei der verwendeten Methode (Kap. 3.3) erhält man bereits ohne Polymerzusatz eine recht gute Auftrennung [28]:

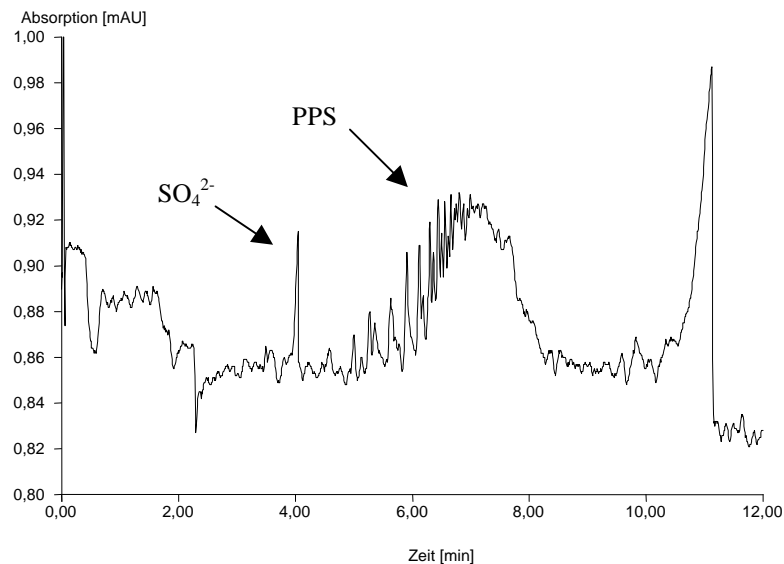


Abb. 3.4³: Pentosanpolysulfat 5 g/l

Inj.: 50 mBar / 0,4 min; Puffer: BTC 10 mM, pH = 4,9; U = - 30 kV (vgl. Kap. 3.7)

Durch Änderung der Injektionsart wird keine Verbesserung erzielt: Wird elektrokinetisch bei -28 kV injiziert (0,4 bzw. 1 min), erhält man statt des vorher erhaltenen Peakmusters nur einen großen Peak, dem ein deutlich kleinerer nachfolgt (Abb. 3.5 und Abb. 3.6). Daher wird der Ansatz der elektrokinetischen Injektion nicht weiterverfolgt.

³ Ab hier handelt es sich bei den Abbildungen um Elektropherogramme. Die Werte der Y-Achse sind in Milli-Absorptionseinheiten angegeben.

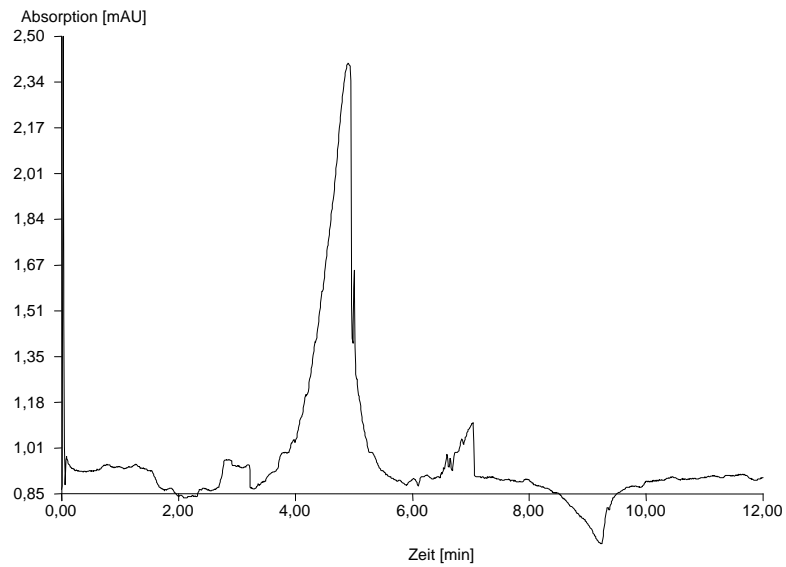


Abb. 3.5: Pentosanpolysulfat 5 g/l
Inj.: -28 kV / 0,4 min, sonst wie in Abb. 3.4

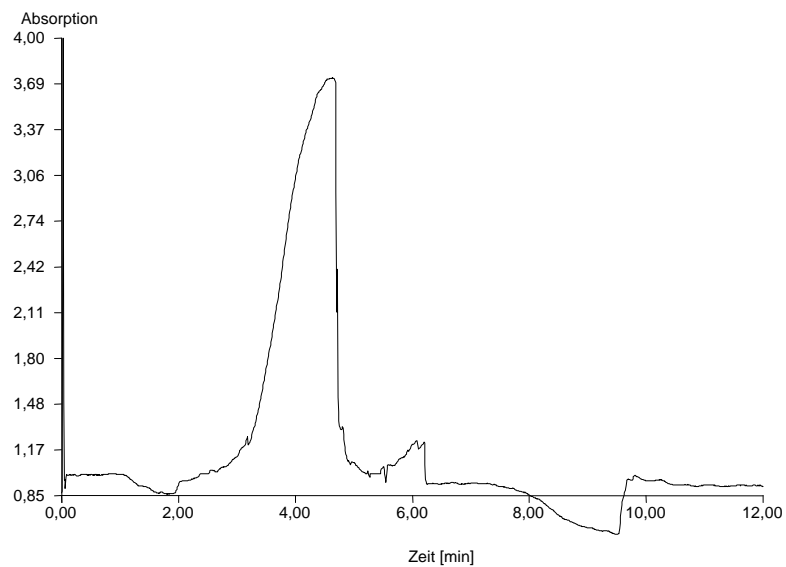


Abb. 3.6: Pentosanpolysulfat 5 g/l
Inj.: -28 kV / 1 min, sonst wie in Abb. 3.4

Eine Verringerung der relativ hohen Trennspannung von - 30 kV (hier wieder mit hydrodynamischer Injektion) wäre ein Ansatz, das Basislinienrauschen zu senken (Abb. 3.7-3.11; zur Theorie der Entstehung des Rauschens bei indirekter Detektion s. Kap. 1.2.6).

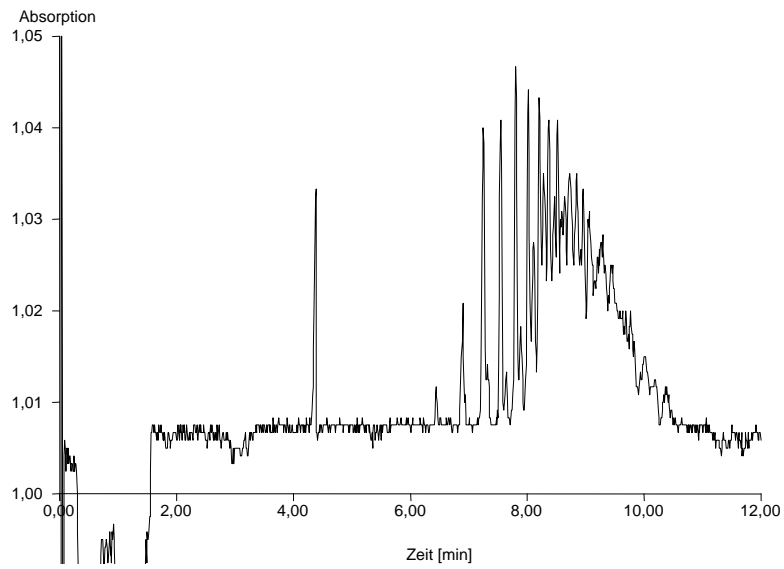


Abb. 3.7: Pentosanpolysulfat 5 g/l
Trennungsspannung $U = -28 \text{ kV}$, sonst wie in Abb. 3.4

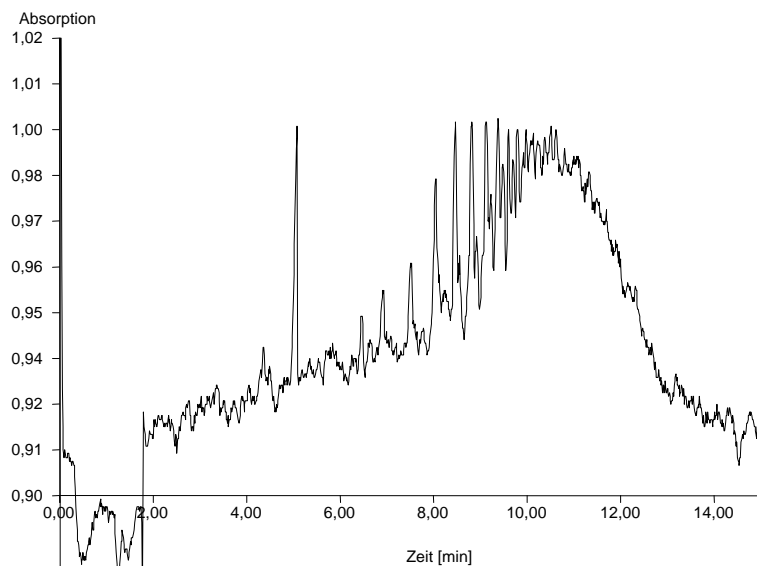


Abb. 3.8: Pentosanpolysulfat 5 g/l
Trennungsspannung $U = -24 \text{ kV}$, sonst wie in Abb. 3.4

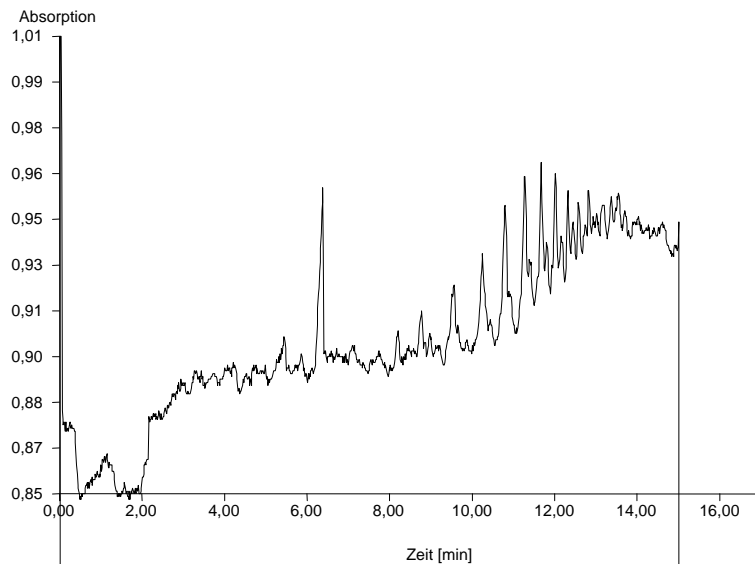


Abb. 3.9: Pentosanpolysulfat 5 g/l
Trennungsspannung $U = -20 \text{ kV}$, sonst wie in Abb. 3.4

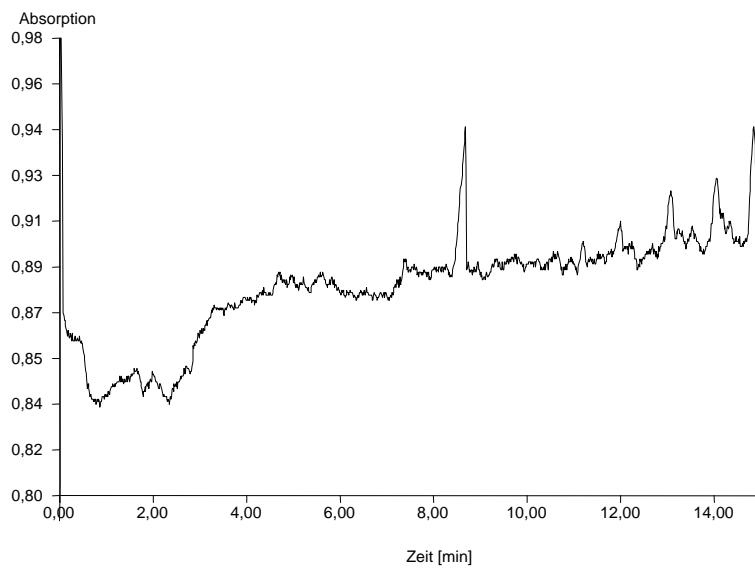


Abb. 3.10: Pentosanpolysulfat 5 g/l
Trennungsspannung $U = -15 \text{ kV}$, sonst wie in Abb. 3.4

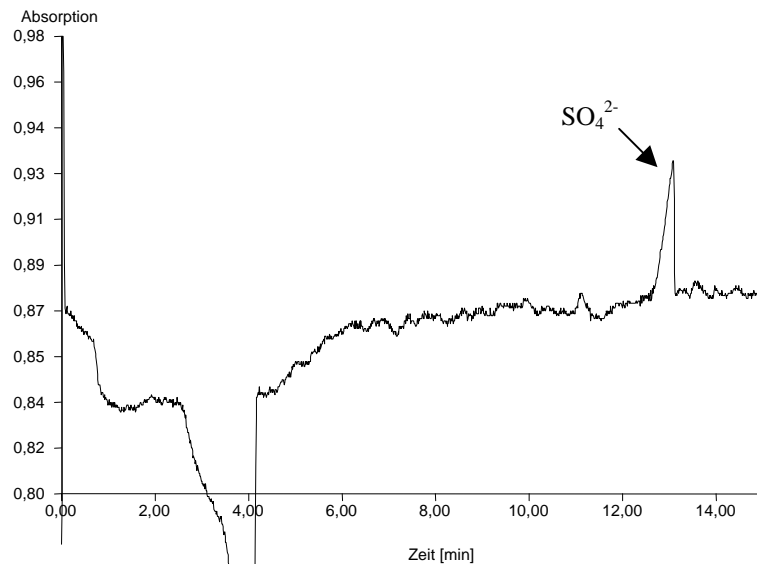


Abb. 3.11: Pentosanpolysulfat 5 g/l
Trennungsspannung $U = -10$ kV, sonst wie in Abb. 3.4

Mit sinkender Trennungsspannung nimmt die Migrationszeit stark zu, das Rauschen aber bleibt weitgehend unverändert, und das Peakmuster erscheint ebenfalls nicht besser aufgelöst. Da die Nettomobilität der Anionen gegen den EOF gerichtet ist, sollten die Peaks bei einem niedrigeren EOF früher erscheinen (d. h. die Bruttomobilität Richtung Anode wäre größer). Hier überwiegt aber der Effekt, daß die Anionen bei kleinerer Feldstärke ebenfalls langsamer wandern, was insgesamt zu einer niedrigeren Bruttomobilität führt (der Sulfat-Peak liegt bei Abb. 3.4 bei ca. 4 min, bei Abb. 3.11 bei ca. 13 min).

Ein weiterer Ansatz ist die Optimierung der Konzentration des Hintergrundelektrolyten: bei einem Vergleich zwischen einem Puffer mit 6 und 12 mM BTC stellt sich die höhere Konzentration, wie aus den Abb. 3.12 und 3.13 ersichtlich, als besser heraus.

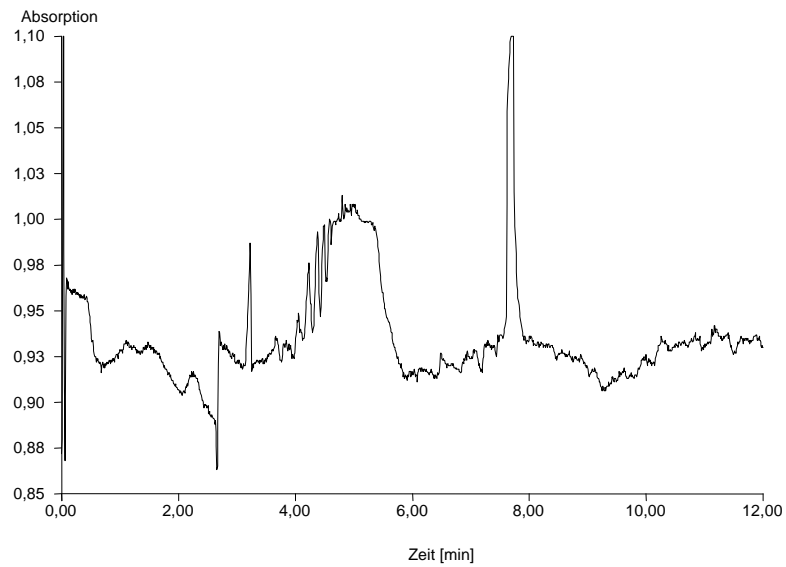


Abb. 3.12: Pentosanpolysulfat 5 g/l
BTC 6mM, sonst wie in Abb. 3.4

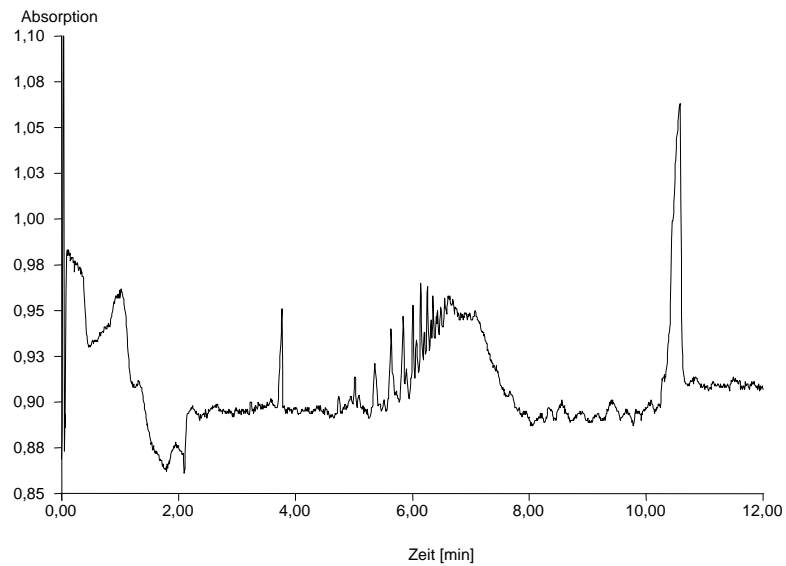


Abb. 3.13: Pentosanpolysulfat 5 g/l
BTC 12 mM, sonst wie in Abb. 3.4

In Abb. 3.13 ist der Fingerprint (s. Kap. 1.2.6) im Bereich von 5 bis 7 min besser aufgelöst als in Abb. 3.12.

3.4.1 Zusatz von Agarose

Beim Zusatz von 0,1% Agarose als Molekularsieb ist eine Verbesserung der Trennung im Fingerprintbereich erkennbar:

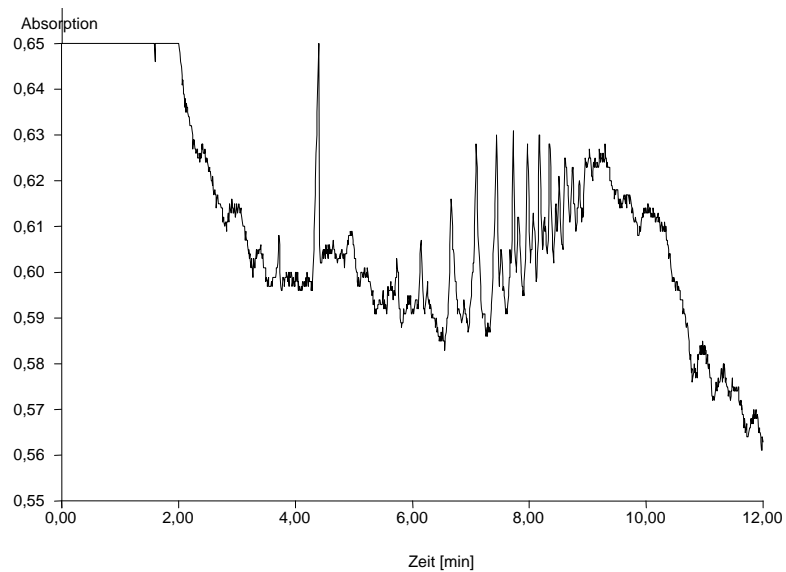


Abb. 3.14: Pentosanpolysulfat 5 g/l

Puffer: BTC 12 mM mit 0,1% Agarose, sonst wie in Abb. 3.4

Bei einer Konzentration über 0,1 % erstarrt die Agarose-Lösung nach dem Abkühlen zu einem Gel, welches sich nicht mehr injizieren läßt. Daher mußte von Versuchen mit einer höheren Konzentration an Agarose abgesehen werden.

3.4.2 Zusatz von Dextran

Ein anderes Polymer, welches als Molekularsieb in Frage kommt, ist Dextran. Hier wird dem BTC-Puffer Dextran 500.000 g/mol (5% / 10% / 15%) zugesetzt. Dabei tritt ein typisches Peakmuster auf, während der in den vorhergehenden Meßreihen erhaltene Fingerprint nach und nach verschwindet (abb. 3.15 bis 3.18):

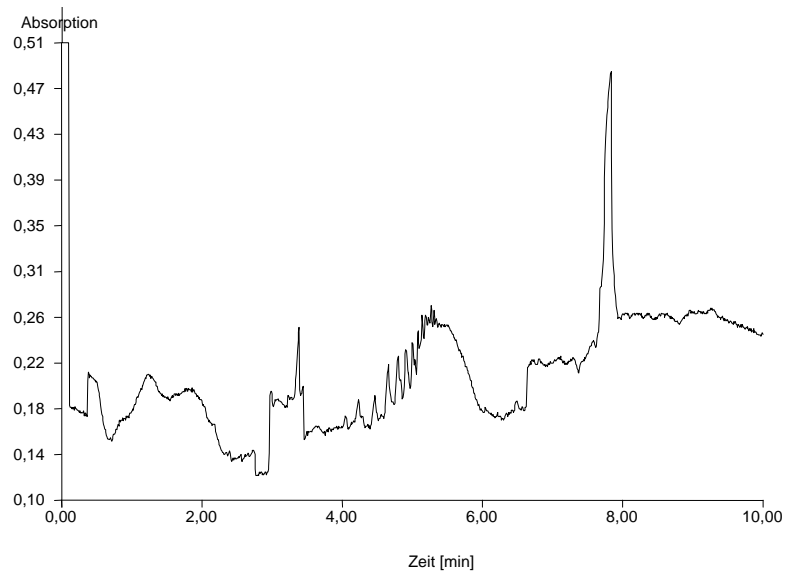


Abb. 3.15: Pentosanpolysulfat 5 g/l

Puffer ohne Dextran, sonst wie in Abb. 3.4

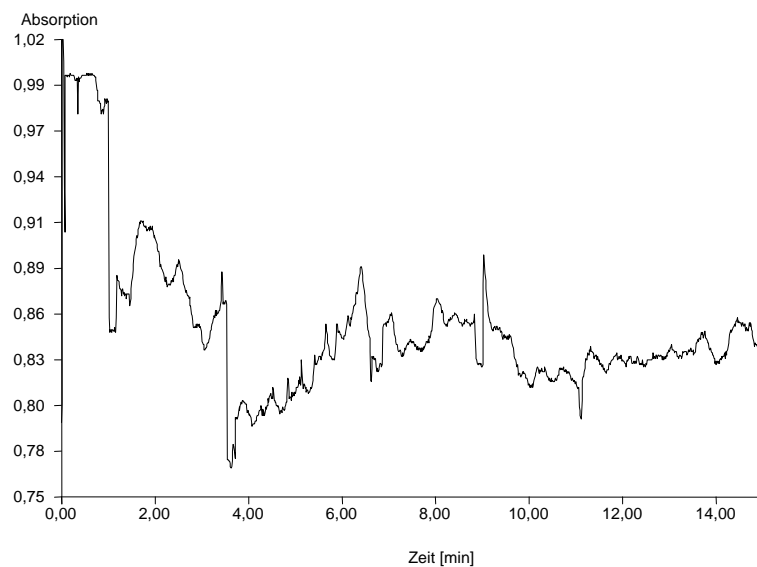


Abb. 3.16: Pentosanpolysulfat 5 g/l

Puffer mit 5% Dextran, sonst wie in Abb. 3.4

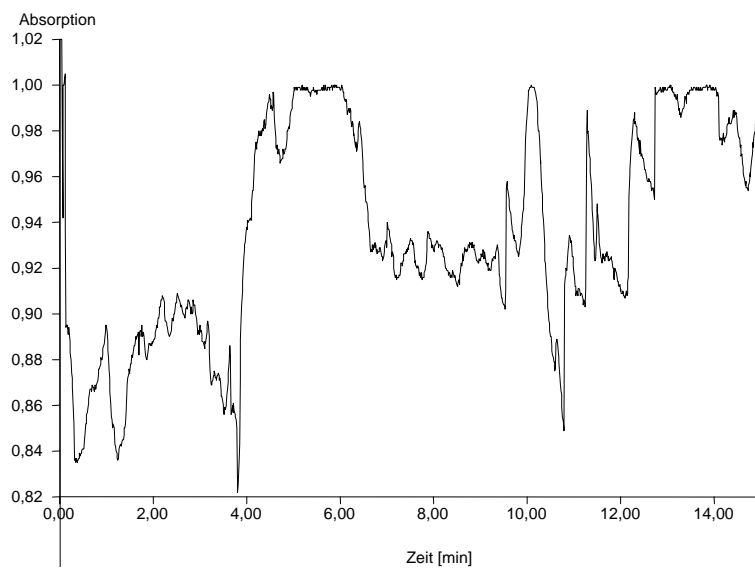


Abb. 3.17: Pentosanpolysulfat 5 g/l
Puffer mit 10% Dextran, sonst wie in Abb. 3.4

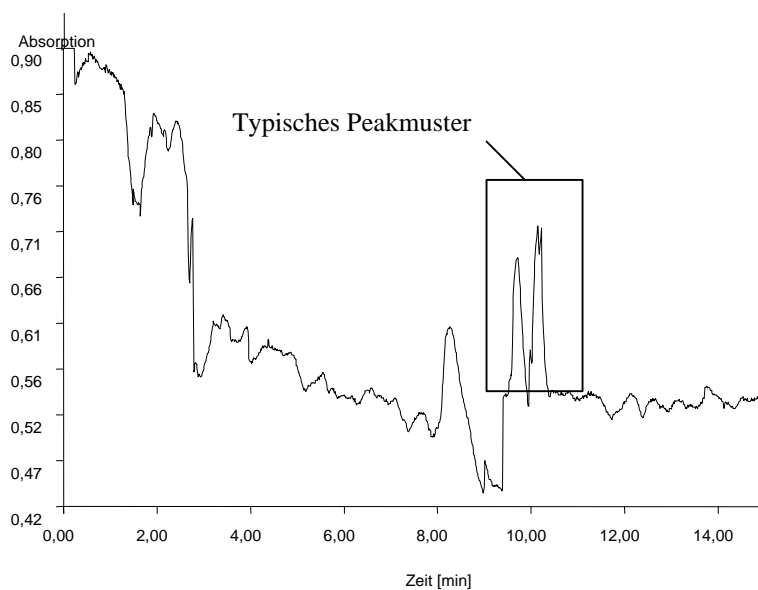


Abb. 3.18: Pentosanpolysulfat 5 g/l
Puffer mit 15% Dextran, sonst wie in Abb. 3.4

Beim Vergleich mit einer Leerinjektion (Puffer mit 15% Dextran) wird jedoch deutlich, daß dieses Peakmuster auf das Dextran selbst und nicht auf das PPS zurückzuführen ist:

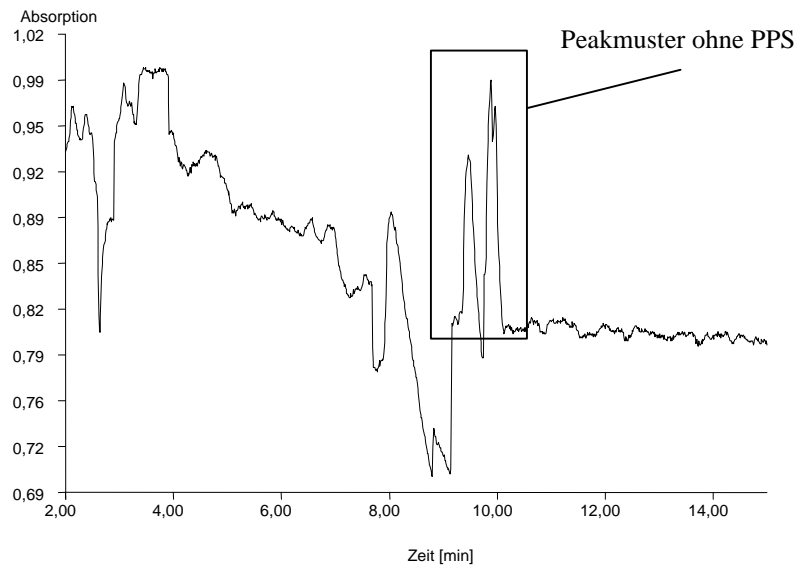


Abb. 3.19: Leerinjektion

Puffer mit 15% Dextran, sonst wie in Abb. 3.4

3.5 Chondroitinsulfat, Heparin und Polygalacturonsäure

Ohne den Zusatz von Polymeren zum Trennpuffer sind bei diesen drei Substanzen hauptsächlich zwei Peaks zu erkennen. Dabei wurde der jeweils zweite Peak (mit „*“ markiert) vermutlich durch pH-Effekte hervorgerufen (vgl. Abb. 3.18):

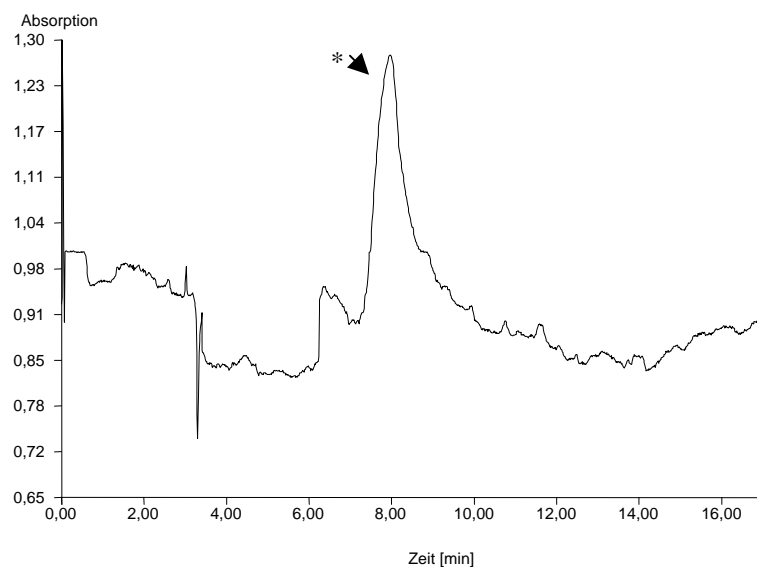


Abb. 3.20: Chondroitinsulfat 5 g/l, sonst wie in Abb. 3.4

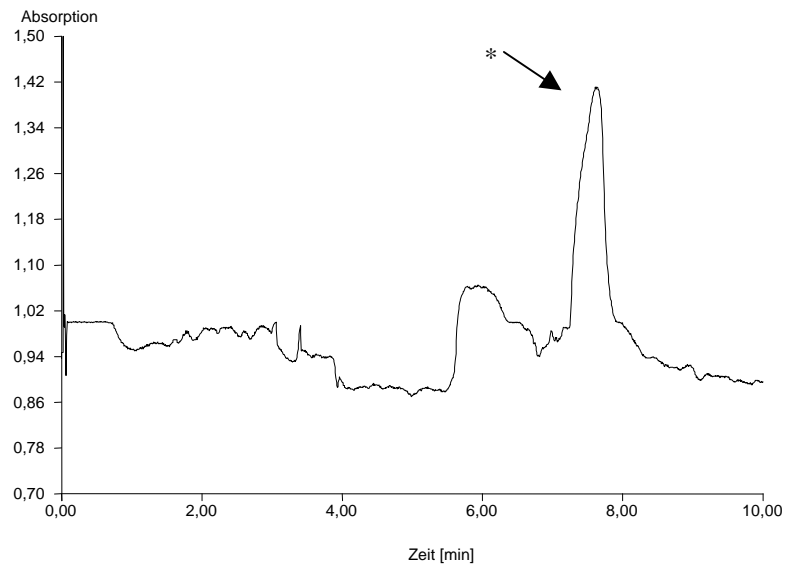


Abb. 3.21: Heparin 5 g/l, sonst wie in Abb. 3.4

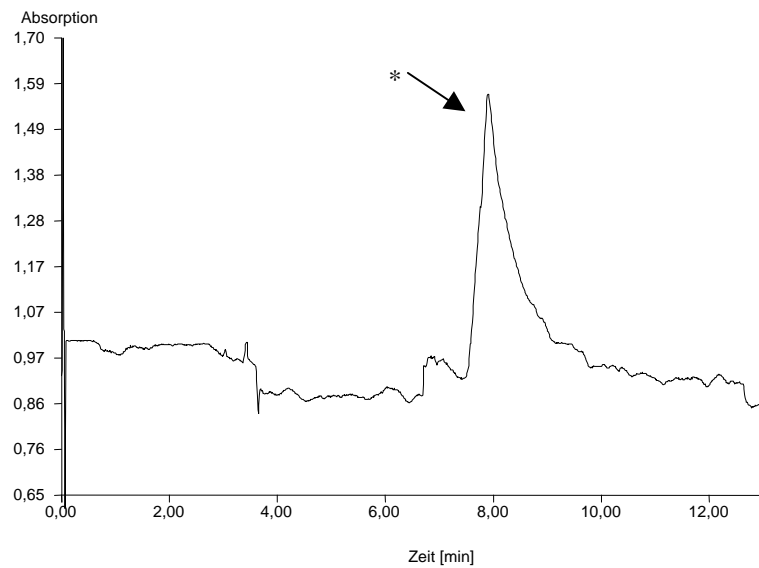


Abb. 3.22: Polygalacturonsäure 5 g/l, sonst wie in Abb. 3.4

Durch Zusatz von 0,1% Agarose ist eine Antrennung sowohl des ersten als auch des zweiten Peaks erkennbar:

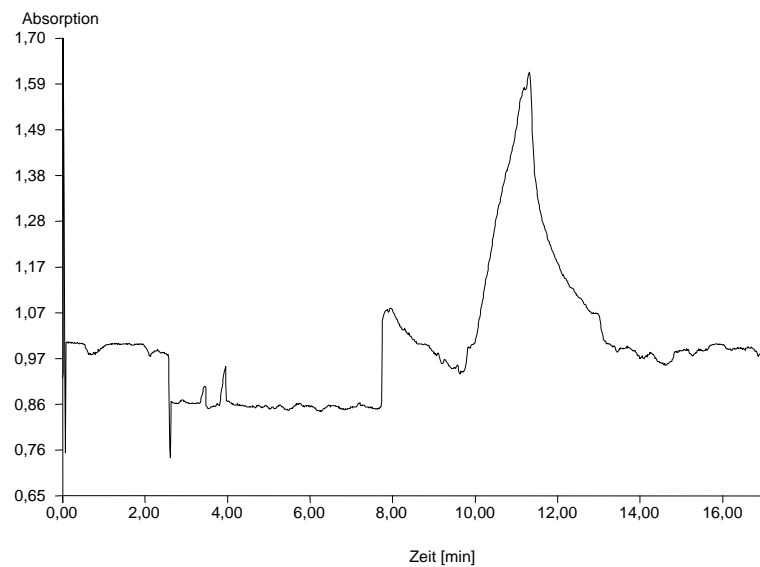


Abb. 3.23: Chondroitinsulfat 5 g/l, 0,1% Agarose, sonst wie in Abb. 3.4

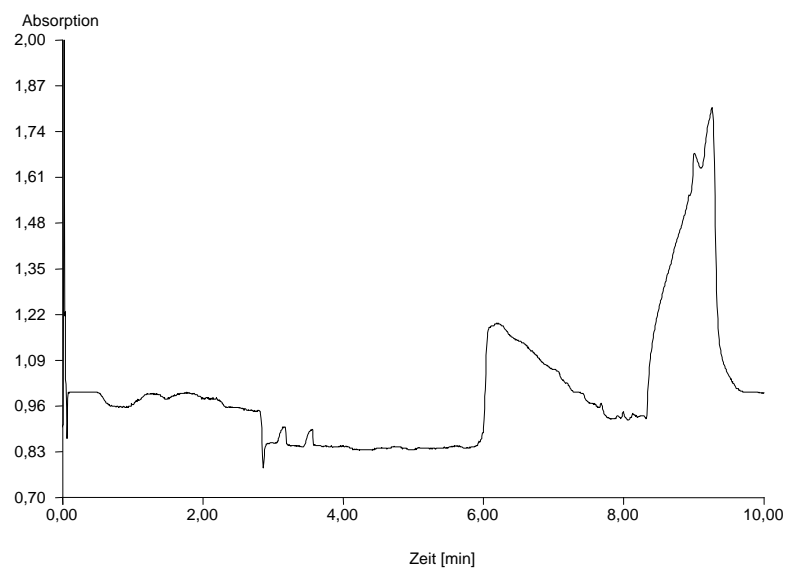


Abb. 3.24: Heparin 5 g/l, 0,1% Agarose, sonst wie in Abb. 3.4

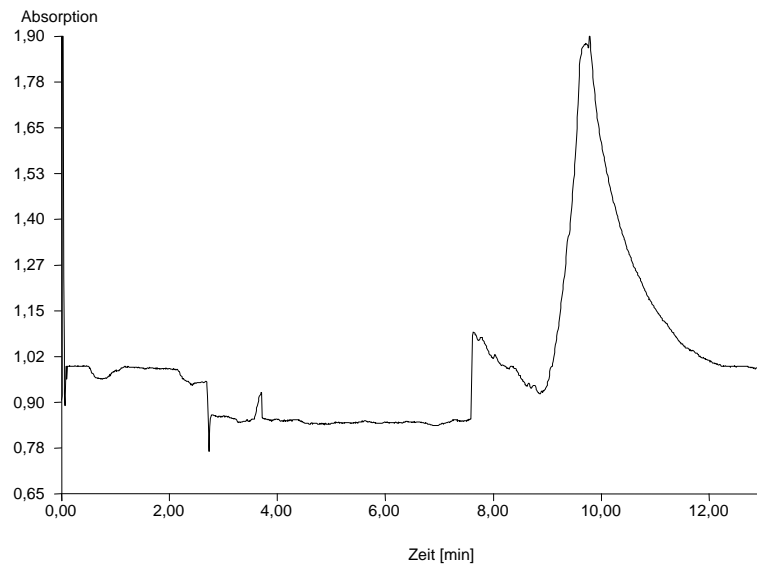


Abb. 3.25: Polygalacturonsäure 5 g/l, 0,1% Agarose, sonst wie in Abb. 3.4

Im Falle von Heparin (vgl. [46]) kam auch PEG 20.000 zum Einsatz. Ein Systempeak bei Zusatz von 3 % PEG ist bei ca. 8 min sehr gut erkennbar, aber leider kann keine Auftrennung des Heparins erzielt werden (Abb. 3.26 und 3.27):

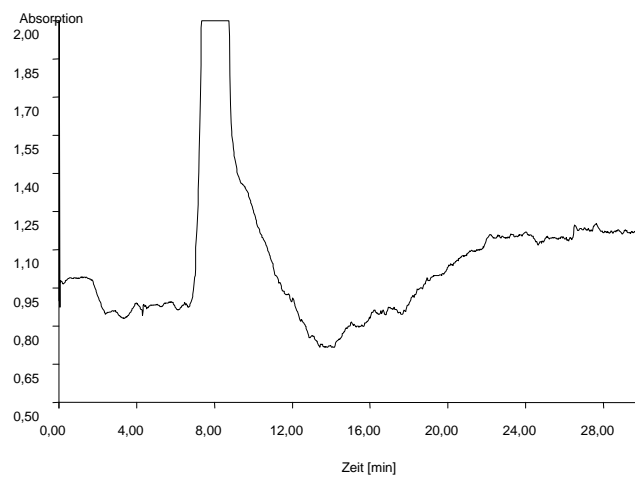


Abb. 3.26: Heparin 5 g/l mit 3 % PEG, sonst wie in Abb. 3.4

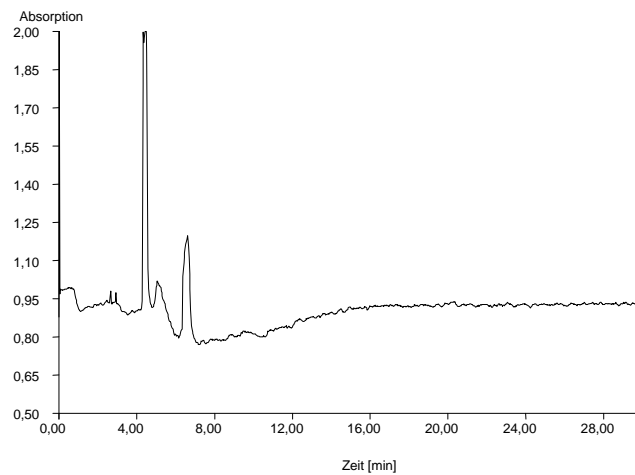


Abb. 3.27: Heparin 5 g/l mit 1 % PEG, sonst wie in Abb. 3.4

Durch eine Verminderung der Konzentration konnte auch keine Trennung erreicht werden. Im Bereich von ca. 30 Min. ergab sich ein nicht interpretierbares Muster, welches aber dem bei der Injektion von Wasser erhaltenen ähnlich ist.

3.6 Substanz PA

Ein Polymergemisch mit einem Acryl-Polymer („Substanz PA“, s. Tab. 3.1) wurde zunächst unter den gleichen Bedingungen wie in Abb. 3.4 vermessen.

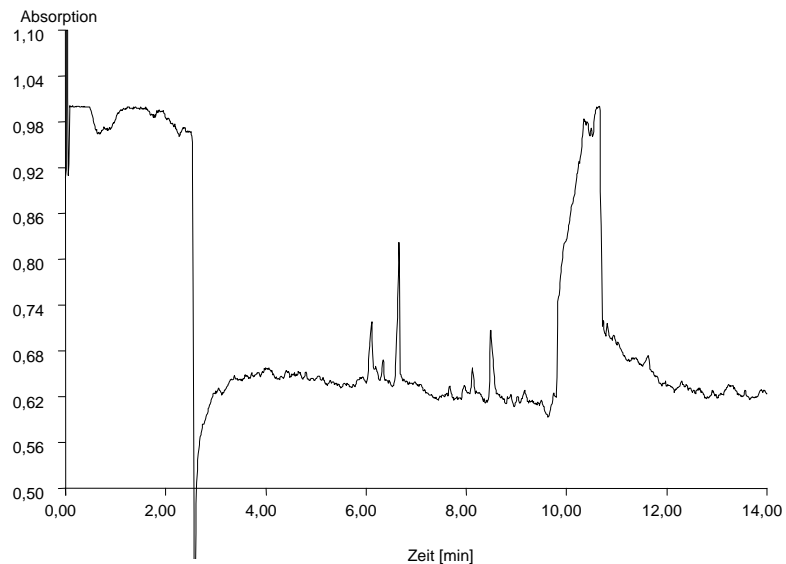


Abb. 3.26: PA 5 g/l, sonst wie in Abb. 3.4

Da der Zusatz von Agarose zu den erfolversprechendsten Trennungen führte, soll hier ein unter Agarosezusatz erhaltenes Elektropherogramm gezeigt werden:

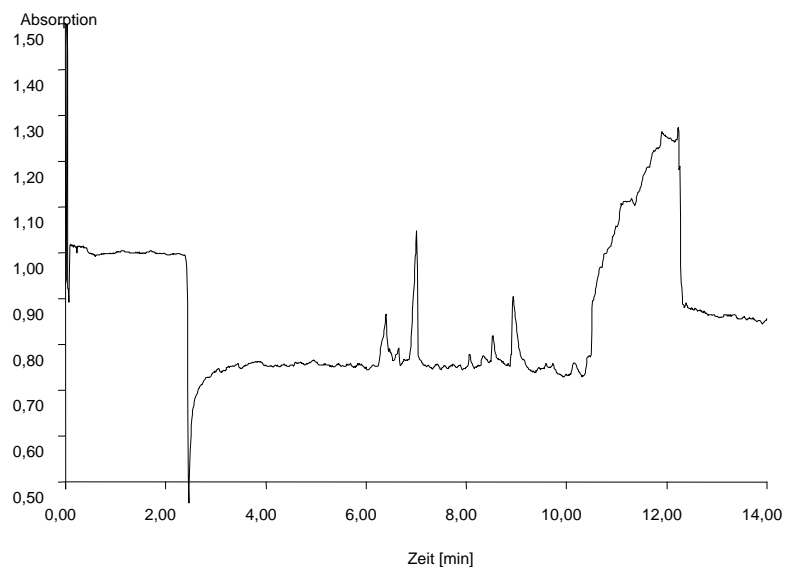


Abb. 3.27: PA 5 g/l mit 0,1% Agarose, sonst wie in Abb. 3.4

Hier ist eine beginnende Verbesserung der Trennung erkennbar, jedoch kann die Konzentration an Agarose wegen der oben beschriebenen Probleme (Kap. 3.4.1) nicht weiter erhöht werden.

3.7 Experimentelles

Für die Versuche wurde, wenn nicht anders erwähnt, ein 10 mM BTC-Puffer (210,14 mg / 100 ml), pH = 4,9 (eingestellt mit 0,1 M NaOH) verwendet (vgl. Kap. 10.3.1). Diesem wurden jeweils Agarose, Dextran 60.000, Dextran 500.000 oder PEG 20.000 zugesetzt. Dabei kann Agarose nicht in Konzentrationsbereichen über 0,1 Gew-% verwendet werden, da sich ansonsten ein Gel ausbildet. Es gibt zwar Methoden, bei denen ersetzbare Gele zur Anwendung kommen. Um die Gele zu verflüssigen und somit wieder aus der Kapillare spülen zu können, wäre ein heizbarer Probenraum nötig, der bei den verwendeten Meßgeräten nicht vorhanden ist (s. Kap. 10.1). Die anderen Polymerzusätze waren in den angegebenen Konzentrationsbereichen gut löslich. Die verwendeten Geräteeinstellungen waren, wenn nicht anders angegeben:

Temperatur:	Raumtemperatur
Injektion:	50 mBar, 0,4 min (24 s)
Spannung:	-28 kV
Kapillare:	60/45 cm x 25 µm
Wellenlänge:	217 nm

Es wurden auch Meßreihen mit elektrokinetischer Injektion durchgeführt (vgl. Abb. 3.5 und 3.6). Dadurch konnte aber keine Verbesserung im Vergleich zur hydrodynamischen Injektion erzielt werden.

3.8 Zusammenfassung der bisher erzielten Trennungen

Für die einzelnen Versuche wurden jeweils folgende Konzentrationen an Zusätzen verwendet:

Agarose: 0,1%
 Dextran 60.000: 1 / 2 / 3%
 Dextran 500.000: 0,5 / 1 / 1,5 / 2 / 3%
 PEG 20.000: 1%

Tab. 3.2 faßt die bisher erzielten Trennungen unter Polymerzusatz zusammen. Dabei bedeutet eine Prozentzahl, daß mit der angegebenen Menge an Polymerzusatz eine Verbesserung der Trennung beobachtet werden kann, während bei den Kombinationen, bei denen nichts eingetragen ist, mit dem jeweiligen Zusatz keine Verbesserung bzw. eine Verschlechterung der Trennung eintritt.

Polymer	Agarose	Dextran 60.000	Dextran 500.000	PEG 20.000
5 g / l Chondroitinsulfat	---	---	1%	1%
10 g / l Heparin	0,1%	---	---	1%
5 g / l Polymergemisch	0,1%	---	---	---
10 g / l Polygalacturonsäure	0,1%	---	1%	---
5 g / l Pentosanpolysulfat*	0,1%*	---	---	---

Tab. 3.2: Trennungen unter Polymerzusatz

* Bei PPS trat auch beim Zusatz von 3% Isopropanol eine Verbesserung der Trennung ein.

3.9 Diskussion

Im vorausgegangenen Kapitel wird der Versuch zur Trennung von Polymeren beschrieben, die nicht im UV-Bereich absorbieren. Dabei wurden diese Polymere nicht derivatisiert, sondern mit Hilfe der indirekten Detektion (Kap. 1.2.6) bestimmt. Da sich die vorliegenden Moleküle der vorliegenden Polymerspezies nur wenig in ihren Masse/Ladungs-Verhältnissen unterscheiden (zur elektrophoretischen Mobilität s. Kap. 1.1.1), mußte ein zusätzlicher Trennmechanismus gefunden werden. Dabei wurden verschiedene Polymere als Pufferzusatz verwendet, um eine Siebwirkung zu erreichen (Kap. 1.2.2). Die Konzentration wurde jedoch stets so niedrig gewählt, daß sich kein Gel ausbildet, so daß unter für die Kapillarelektrophorese normalen Bedingungen gearbeitet werden konnte. Bei den in diesem Kapitel beschriebenen Experimenten wurden Teilerfolge erzielt, jedoch sind der Vorgehensweise Grenzen gesetzt. Wie aus einer erst kürzlich erschienen Veröffentlichung hervorgeht [80], konnte auch mit Größenausschluß-Kapillarelektrochromatographie (SE-CEC) kein wesentlicher Fortschritt erzielt werden. Es ist zwar bekannt, daß die Trennleistung mit einer Erniedrigung der Probenkonzentration steigt, andererseits benötigt man eine ausreichend hohe Konzentration, um den Analyten überhaupt detektieren zu können, d. h., das Signal/Rausch-Verhältnis muß ausreichend hoch sein. Letztlich könnte die Methodenentwicklung zur Trennung von Polymeren mittels CE durch eine Verbesserung der Detektoren, also durch eine Weiterentwicklung in der Gerätetechnik, zum Erfolg führen, da dann die Verwendung von kleineren Probenkonzentrationen möglich wäre. Auf diese Weise könnten gleichzeitig eine ausreichende Auflösung und ein akzeptables Signal/Rausch-Verhältnis erreicht werden.

4 Versuche zur Trennung von Taurolidin von seinen Verunreinigungen

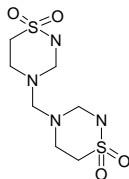


Abb. 4.1: Taurolidin

4.1 Verwendung und Darstellung

Zunächst soll auf Eigenschaften, Darstellung, therapeutische Anwendung und Wirkung eingegangen werden. Taurolidin {4,4'-Methylenbis(tetrahydro-1,2,4-thiadiazin-1,1-dioxid); 4,4'-Methylenbis-1,2,4-thiadiazin-1,1-dioxid); 4,4'-Methylenbis[tetrahydro-2*H*-1,2,4-thiadiazin]-1,1,1',1'-tetraoxid; Taurolin[®]; CAS-Nr. [19388-87-5]} ist ein weißes, wasserlösliches Pulver mit einem Schmelzpunkt von 163 -179 °C ($M_r = 284,4$ g/mol) [47]. Die Synthese geht aus von Taurinamid [4378-70-5], welches mit Formaldehyd [50-00-0] zunächst zu Taurultam [38668-01-8] umgesetzt und dann zum Taurolidin kondensiert wird:

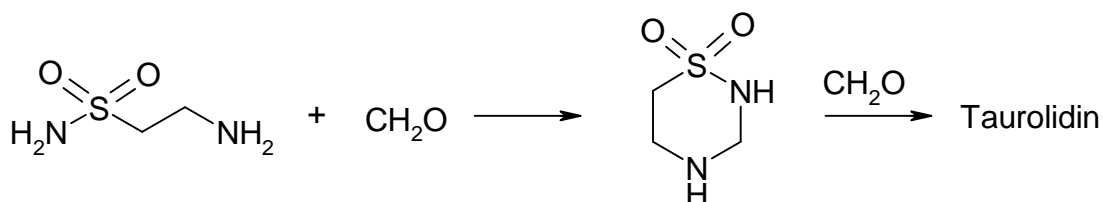


Abb. 4.2: Darstellung von Taurolidin

Taurinamid wird seinerseits nach einem patentierten Verfahren [48] ausgehend von 2-Chlorethansulfonylchlorid (CAS-Nr. [1622-32-8]) dargestellt:

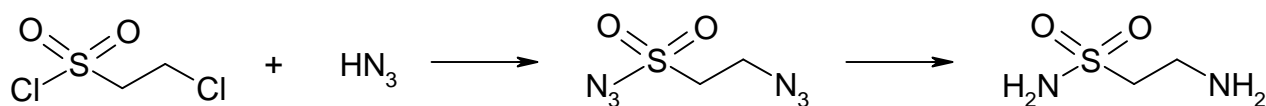


Abb. 4.3: Darstellung von Taurinamid

Es findet Verwendung als Chemotherapeutikum zur Lokalthherapie, bei lokaler und diffuser Peritonitis, sowie bei Weichteil- und Knochenverletzungen [47].

Für die CE wie für jede andere Analysenmethode, die im wäßrigen Medium arbeitet, ist das entsprechende Gleichgewicht in wäßriger Lösung (hier das von Taurolidin, Methyloyltaurultam und Taurultam) von großem Interesse. Es soll hier kurz dargestellt werden:

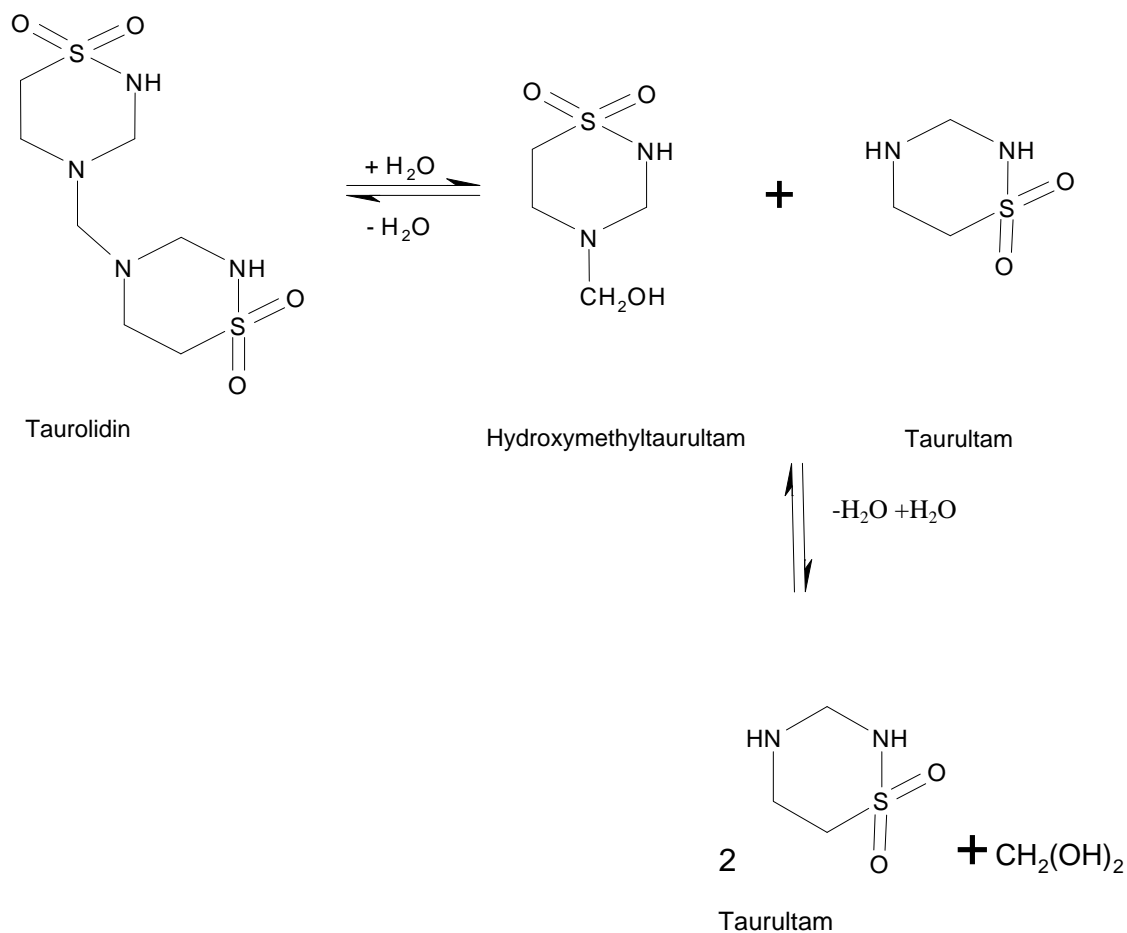


Abb. 4.4: Gleichgewicht von Taurolidin, Methyloyltaurultam und Taurultam in wäßriger Lösung

Um sicherzustellen, daß im Endprodukt keine Verunreinigungen durch die Edukte enthalten sind, soll eine Methode entwickelt werden, mit der es möglich ist, die Zwischenprodukte der Synthese (Taurultam, Taurin, Taurinamid und Taurylazid) von Taurolidin zu trennen und auf diese Weise Verunreinigungen durch dieselben nachzuweisen.

4.2 Bisher verwendete Methoden

Die bisher zur Qualitätskontrolle von Taurolidin benutzten Methoden liefern meist unbefriedigende Ergebnisse. Zudem muß Taurolidin, um eine bessere Absorption im UV-Bereich zu gewährleisten (z. B. für die HPLC), zunächst derivatisiert werden. Bisherige Ansätze zur Analytik von Taurolidin sind eine NMR-Studie von Knight et al. [49], eine GC-Methode [49], eine GC- und HPLC-Methode von Erb et al. [50], eine polarographische Methode von Woolfson et al. [51] sowie eine HPLC-Methode vom gleichen Autor [52]. Hier soll nur kurz auf die neueste Methode eingegangen werden [52]: Taurultam, ein sekundäres Amin, wird zunächst mit 4-Chlor-7-nitro-benzo-2-oxa-1,3-diazol (4-Chlor-7-nitro-benzofurazan, NBD-chlorid, CAS-Nr. [10199-89-0]) derivatisiert und mit Umkehrphasen-HPLC mittels Fluoreszenz-Detektion nachgewiesen. Taurinamid, ein primäres Amin, wird mit o-Phthalaldehyd-ethanthiol (OPT) derivatisiert und ebenfalls mittels Fluoreszenz-Detektion bestimmt. Auf diese Weise macht man sich den hauptsächlichen Unterschied zwischen Taurultam (ein sekundäres Amin) und seinem wichtigsten Abbauprodukt, Taurinamid, zunutze. Taurolidin ist zwar wie Taurultam auch ein sekundäres Amin, jedoch ist davon auszugehen, daß es in wäßriger Lösung praktisch vollständig zu Taurultam zerfällt (vgl. Abb. 4.4) [53]. So können also in zwei getrennten Analysen Taurultam und Taurinamid bestimmt werden.

Taurolidin und seine Abbauprodukte besitzen bei einer Wellenlänge von 200 nm noch eine ausreichende Absorption für die CE mit UV-Detektion, so daß hier keine Derivatisierung notwendig ist. Da, wie auch in handelsüblichen Zubereitungen, Taurolidin hauptsächlich als Taurultam vorliegt [52, 54], ist es für die Qualitätskontrolle ausreichend, die Verunreinigung an anderen Edukten zu prüfen.

4.3 Trennungen von Taurolidin mit einer FZCE-Methode

Zunächst wird eine Trennung von Taurolidin ($pK_B \approx 5,5$) mit einem Standard-Phosphatpuffer folgender Zusammensetzung durchgeführt [4]:

779,2 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und

61,9 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

für 100 ml Phosphatpuffer (60 mM / pH = 6,0 / Detektionswellenlänge $\lambda = 200$ nm).

Die Kapillarlänge beträgt 42 cm (35 cm bis zum Detektor), die Spannung ist 30 kV.

Taurolidin verfügt bei der verwendeten Wellenlänge zwar, wie in Kap. 4.2 erwähnt, über eine ausreichende Absorption, wegen der sehr ähnlichen elektrophoretischen Mobilitäten der zu untersuchenden Substanzen erweist sich das verwendete System jedoch noch als zu wenig selektiv. Dies soll anhand eines Beispiелеktropherogramms gezeigt werden (Abb. 4.5).

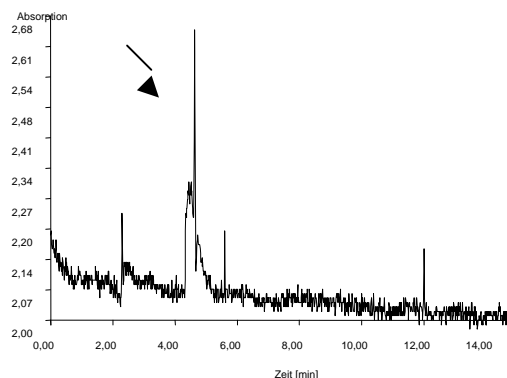


Abb. 4.5: Taurolidin 1 g/l, Phosphat 60 mM, pH = 6,0

Deshalb wird versucht, durch Zusatz einer oberflächenaktiven Substanz, welche als Mizellbildner fungiert, die Selektivität zu verbessern (vgl. MEKC Kap. 1.2.3).

4.4 Trennungen von Taurolidin mit einer MEKC-Methode

4.4.1 Natriumtetraborat / SDS-Puffer (je 100 mM, pH = 9,2)

Für die MEKC-Methode wird ein häufig benutzter Standard-Puffer verwendet:

2,38 g Natriumtetraborat (25 mM) und

7,21 g SDS

für 250 ml Puffer (entspricht je 100 mM an Borat bzw. SDS),

pH \approx 9,2.

Sonstige Bedingungen s. Kap. 4.3.

Mit dieser Methode wird neben Taurolidin ein zweiter Peak sichtbar, der vermutlich vom Taurultam herrührt (vgl. Abb. 4.4 und 4.6). Taurinamid-Hydrochlorid migriert zwischen diesen beiden Peaks. Die Elektropherogramme entsprechen denen im folgenden Abschnitt, jedoch liegen die Migrationszeiten mit der hier verwendeten Kapillare (42 cm) zwischen ca. 5 min. für Taurultam und ca. 9 min. für Taurin. Durch Verwendung einer kürzeren Kapillare (25 cm) können erwartungsgemäß viel kürzere Migrationszeiten erreicht werden (2,5 min. für Taurultam und 4 min. für Taurin, Abb. 4.6 bis 4.11, vgl. Kap. 1.1).

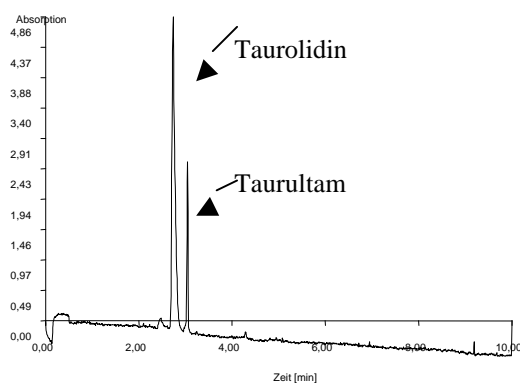


Abb. 4.6: Taurolidin 1%

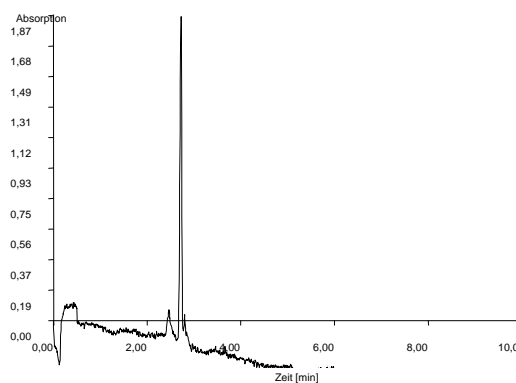


Abb. 4.7: Taurultam 0,25%

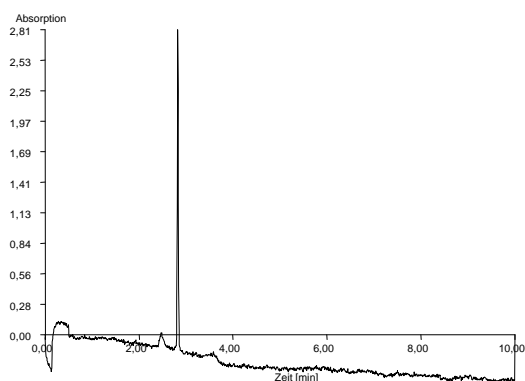


Abb. 4.8: Taurinamid 0,25%

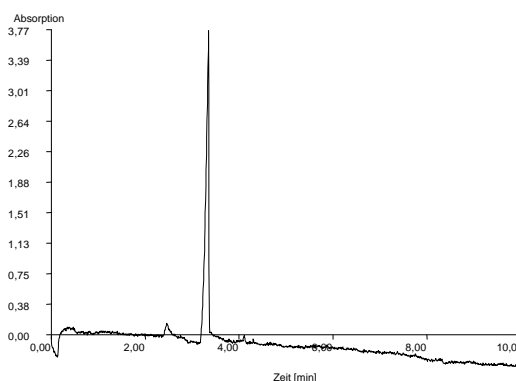


Abb. 4.9: Taurylazid 0,25%

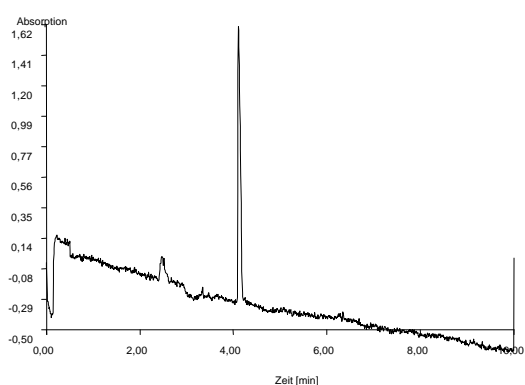


Abb. 4.10: Taurin 0,25%

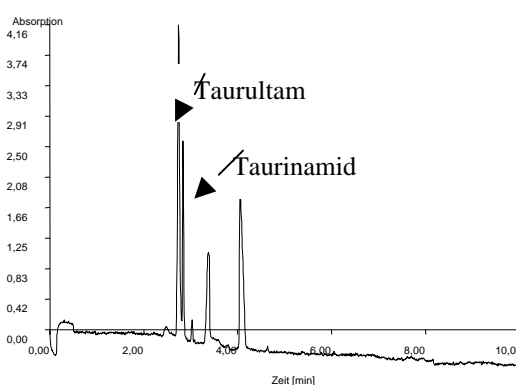


Abb. 4.11: Mischung¹ mit je 0,25% (vgl. Tab. 4.1a)

Wie aus den Abb. 4.6 bis 4.11 ersichtlich, wird beinahe eine Basislinientrennung zwischen Taurultam und Taurinamid erreicht. Somit ist die hier vorgestellte Methode ausreichend für eine Reinheitskontrolle des Taurolidins. Ihre großen Vorteile sind vor allem die kurzen Analysenzeiten und die Einfachheit der Handhabung, da der Derivatisierungsschritt entfällt. Für eine Quantifizierung, besonders des Taurultams, ist jedoch eine Basislinientrennung zwischen Taurultam und Taurinamid anzustreben.

Zur Verbesserung der Auftrennung des Peakpaares Taurultam-Taurinamid stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung: So kann versucht werden, durch eine Optimierung der Spannung, des pH-Wertes und der SDS-Konzentration eine Verbesserung zu erzielen. Dies ist auf den nachfolgenden Seiten dargestellt. Als Analyt wird, wenn nicht anders vermerkt, jeweils eine Lösung der in Fußnote 1 erwähnten Substanzen verwendet.

¹ Taurolidin, Taurultam, Taurinamid, Taurylazid und Taurin

Zunächst werden mehrere Versuchsreihen mit anderen Spannungen (20 bzw. 25 kV) durchgeführt. Dies führt jedoch gegenüber den oben gezeigten Elektropherogrammen lediglich zu einer Verlängerung der Migrationszeiten, aber zu keiner Verbesserung in der Auflösung des Peakpaares Taurultam-Taurinamid (Abb. 4.12 bis 4.14):

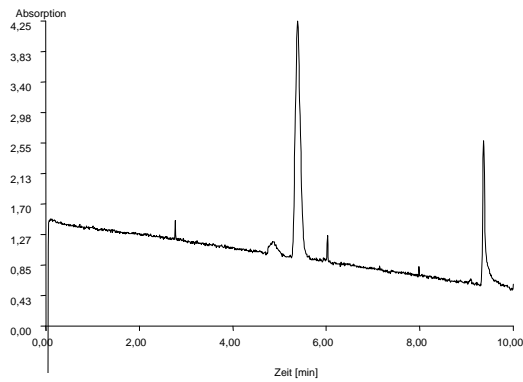


Abb. 4.12: Mischung bei U = 20 kV

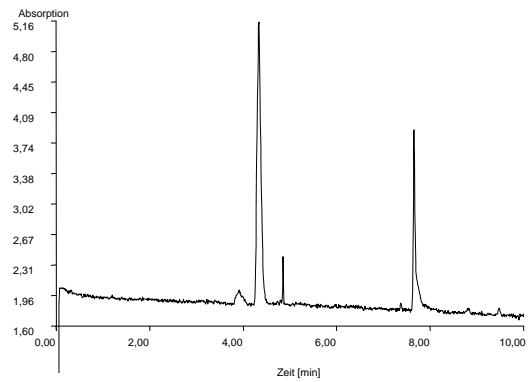


Abb. 4.13: Mischung bei U = 25 kV

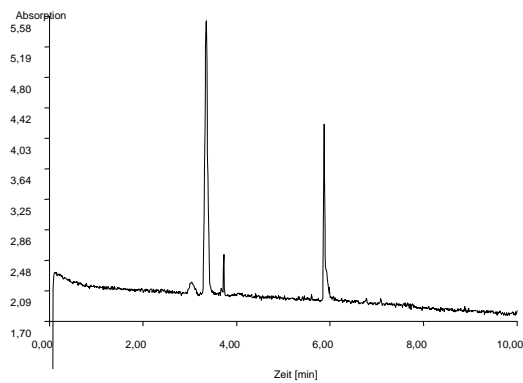


Abb. 4.14: Mischung bei U = 30 kV

4.4.2 Natriumtetraborat / SDS-Puffer (je 100 mM, pH 9)

Auch werden Versuche mit veränderter Pufferzusammensetzung durchgeführt. Dazu wird ein Teil des Tetraborats nach und nach durch Borsäure ersetzt, wobei die Gesamtkonzentration an Borat von 100 mM beibehalten wird. Dadurch kann bei gleicher Konzentration an Borat ein jeweils niedrigerer pH-Wert erzielt werden, was mit einer Abnahme des EOF einhergeht. Die Folge ist, wie auch in Kap. 4.4.1, eine Zunahme der Analysenzeit, ohne daß eine Verbesserung der Trennung beobachtet werden kann. Dazu sollen an dieser Stelle einige Elektropherogramme gezeigt werden (da beim zur Verfügung stehenden Gerät die Kapillarlänge 60 cm beträgt, sind die Läufe entsprechend länger; Abb. 4.15 und 4.16).

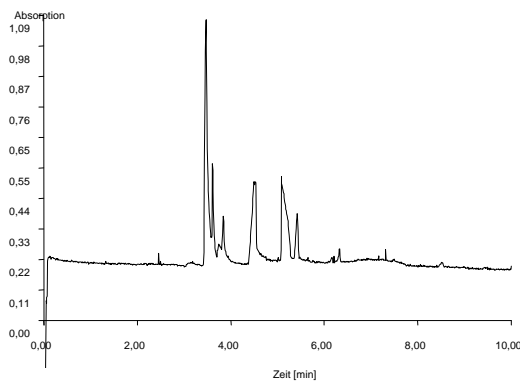


Abb. 4.15: 80 % Borat, 20 % Borsäure
pH = 9,0

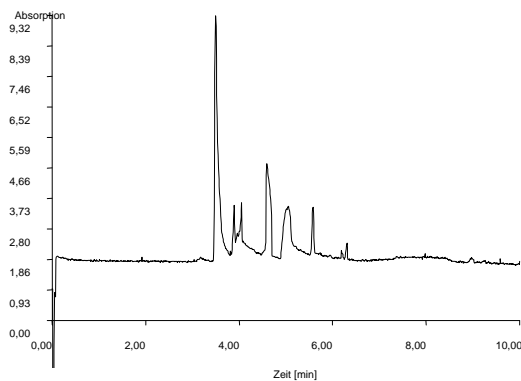


Abb. 4.16: 60 % Borat, 40 % Borsäure
pH = 8,7

4.4.3 Läufe unter Zusatz von Formaldehyd

Da sich Taurolidin in wäßriger Lösung im Gleichgewicht mit Taurultam steht ([52], vgl. Abb. 4.4), werden Versuche mit Taurolidin in Formaldehyd-Lösung durchgeführt. Ein Vergleich von NMR-Spektren von Taurolidin mit Spektren einer Mischung aus Taurultam und Formaldehyd, jeweils in D_2O , deuten darauf hin, daß sich in beiden Fällen dasselbe Gleichgewicht einstellt, da Taurolidin in Lösung aus Taurultam und Formaldehyd gebildet wird ([49], vgl. Abb. 4.2). Daher ist darauf zu schließen, daß in wäßriger Lösung der Zerfall von Taurolidin durch Zusatz von Formaldehyd zumindest teilweise verhindert wird. In dieser Versuchsreihe werden sowohl die verschiedenen Substanzen als auch der Puffer in einer Lösung mit 37% Formaldehyd (Ph.Eur., [55]) angesetzt und wegen der Bildung von festem, polymerem Formaldehyd (Paraformaldehyd) vor der Verwendung filtriert (Porengröße: $0,2\text{ }\mu\text{m}$). Der Puffer im Auslaßgefäß wird ohne SDS als wäßrige Lösung hergestellt. Da einige Peaks sehr spät erscheinen (Taurylazid, Paracetamol), werden die Läufe hier mit einer Dauer von 60 min. durchgeführt. Die Peakformen weisen auf eine Gleichgewichtseinstellung während der elektrophoretischen Trennung hin. Dies steht in Einklang mit den weiter oben erwähnten NMR-Ergebnissen [49]. Allerdings wird der EOF stark von Formaldehyd beeinflusst, so daß ein direkter Vergleich mit den in wäßriger Lösung erhaltenen Elektropherogrammen (Kap. 1.3.1) nicht möglich ist (Abb. 4.17 und 4.18). Zu Vergleichszwecken wird in Abb. 4.19 eine Elektropherogramm von Paracetamol in Formaldehyd gezeigt.

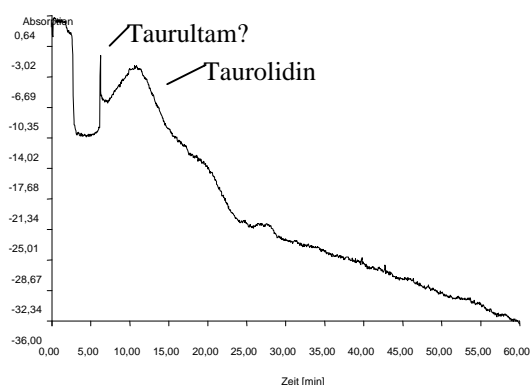


Abb. 4.17: Taurolidin 0,25% in 37% Formaldehyd

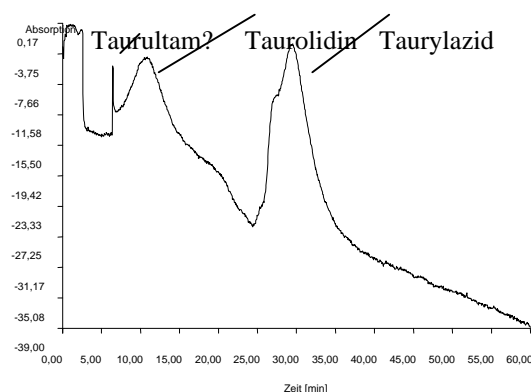


Abb. 4.18: Mischung je 0,5% in 37% Formaldehyd

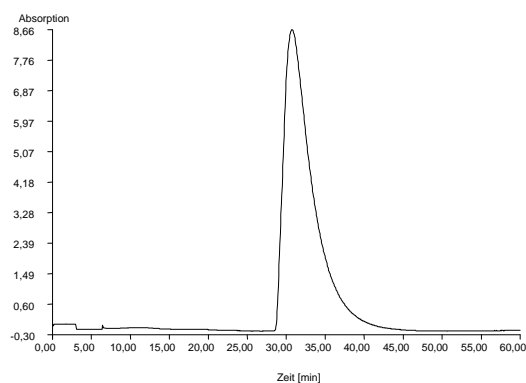


Abb. 4.19: Paracetamol 0,25 % in 37% Formaldehyd

Insgesamt erweist sich diese Methode, wie aus den oben gezeigten Elektropherogrammen hervorgeht, als nicht sehr stabil, da stark schwankende Migrationszeiten erhalten werden. Darüberhinaus ist es nicht möglich, die Peaks eindeutig zuzuordnen. Deshalb wurden auch Versuche mit einer 17,5%igen Formaldehydlösung durchgeführt. Diese führten wegen der oben erwähnten Probleme ebenfalls nicht zum erwünschten Ergebnis, Taurolidin neben Taurultam trennen zu können.

4.4.4 Natriumtetraborat-SDS / Acetonitril

Durch Zusatz von organischen Lösungsmitteln kann die Selektivität des Systems verändert werden [21]. Hier werden dem Borat-SDS Puffer jeweils 1,7 / 3,3 / 5,0 / 6,7 / 8,3 bzw. 10,0 % Acetonitril hinzugefügt. Statt einer Verbesserung der Auflösung kam es zu einem Zusammenlaufen der ersten beiden Peaks (Taurultam und Taurinamid) (Abb. 4.20 bis 4.25, vgl. Abb. 4.11).

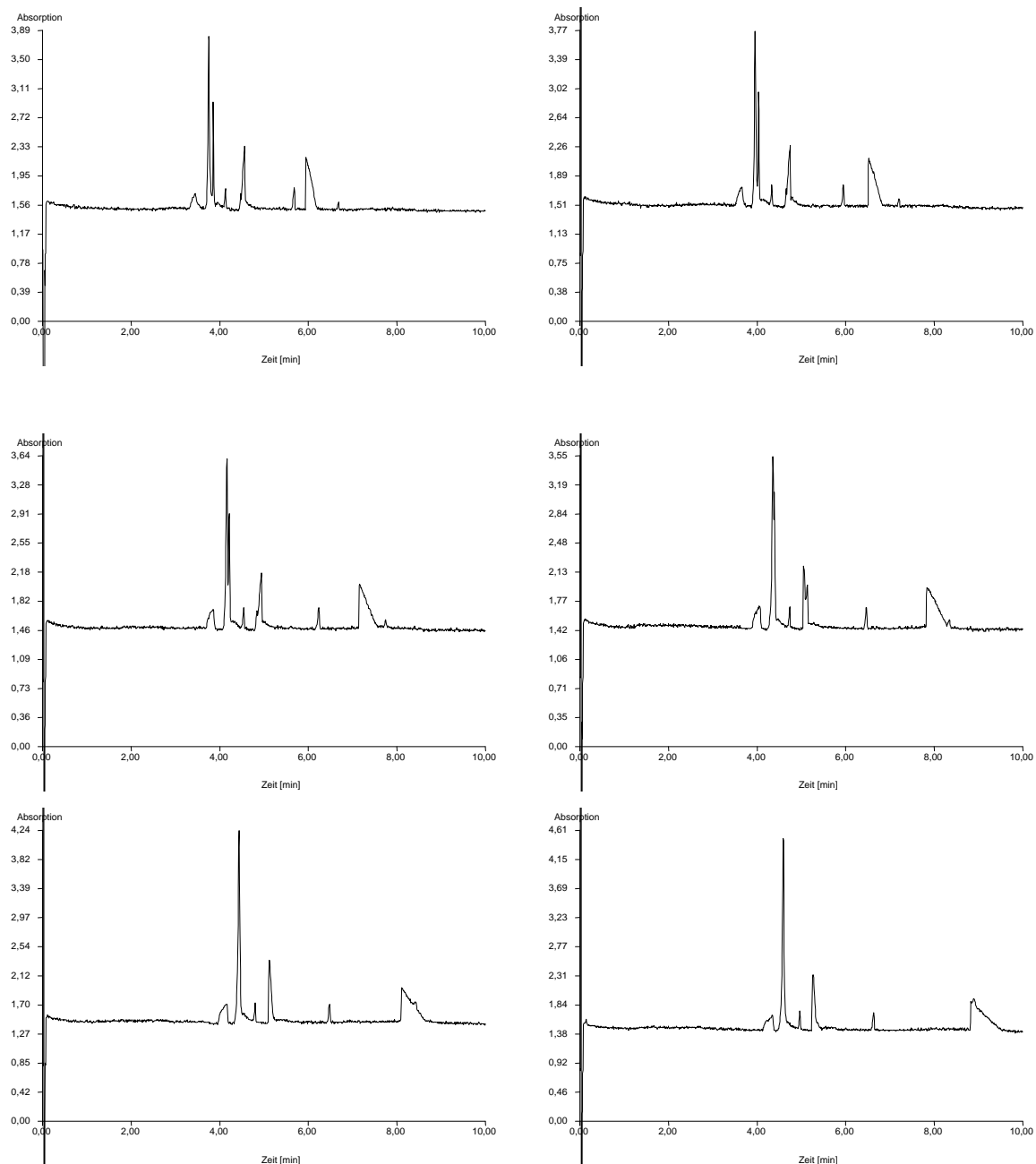


Abb. 4.20 – 4.25: Zusatz von 1,7 – 10,0 % Acetonitril zum Boratpuffer, sonst wie in Abb. 4.11

4.4.5 Natriumtetraborat-SDS / 1-Hexanol

Zum Erzielen der erwünschten Selektivitätsveränderung wird hier 1-Hexanol eingesetzt [21]. Bei Zusatz von 0,5, 1 bzw. 2 % 1-Hexanol zur Pufferlösung tritt allerdings derselbe Effekt wie bei Acetonitril-Zusatz auf (4.4.4, Taurultam und Taurinamid laufen zusammen; Abb. 4.26 bis 4.28).

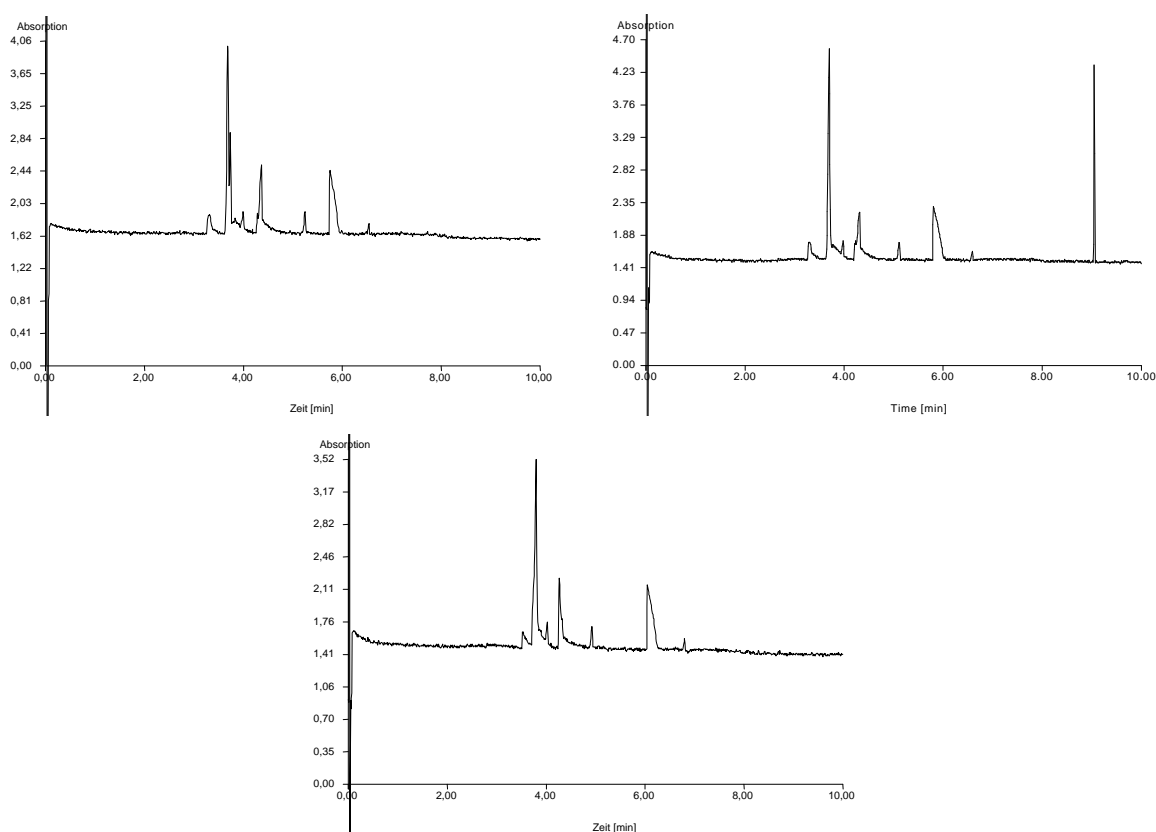


Abb. 4.26 – 4.28: Zusatz von 0,5 – 2 % 1-Hexanol,
sonst wie in Abb. 4.11

4.4.6 Natriumtetraborat-SDS / Harnstoff

In mehreren Veröffentlichungen (z. B. [56]) wird auch Harnstoff als erfolgversprechender Zusatz vorgestellt, durch den das analytische Fenster und die Auflösung verbessert wird [9]. Daher wurde eine Meßreihe unter Zusatz von 2, 4, 6 bzw. 8 % Harnstoff durchgeführt. Durch die beträchtliche Eigenabsorption von Harnstoff im UV-Bereich kommt es zu negativen Peaks (vgl. Kap. 1.2.6). Außerdem verschlechterte sich das Signal/Rausch-Verhältnis (Abb. 4.29 bis 4.31).

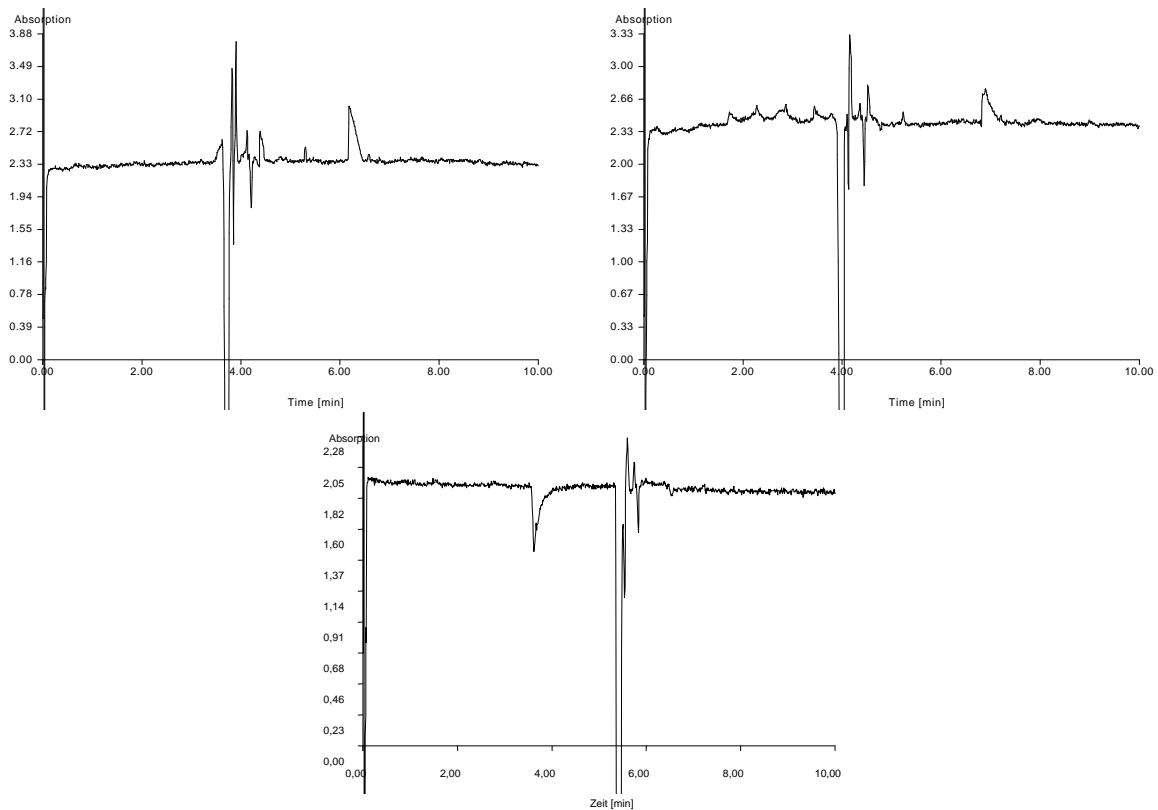


Abb. 4.29 – 4.31: Zusatz von 2 – 8 % Harnstoff,
sonst wie in Abb. 4.11

4.4.7 Natriumtetraborat-SDS / Cyclodextrine

Ein anderer Ansatz zur Veränderung der Selektivität ist die Zugabe von β -Cyclodextrinen (β -CD). Diese werden auch, wie in Kap. 1.2.4 ausgeführt, als chirale Selektoren verwendet. Bei Zugabe entsprechender Cyclodextrine sind mehr Peaks als vorher sichtbar, obwohl Taurultam und Taurinamid nicht chiral sind: In den Elektropherogrammen Abb. 4.33 und 4.35 können für Taurultam und Taurinamid drei, in den Abb. 4.32 und 4.34 sogar vier Peaks beobachtet werden (zwei waren zu erwarten). Dieser Effekt konnte bisher nicht erklärt werden (Abb. 4.32 bis 4.35, vgl. auch die Strukturen der jeweiligen Verbindungen in Abb. 4.3 und 4.4).

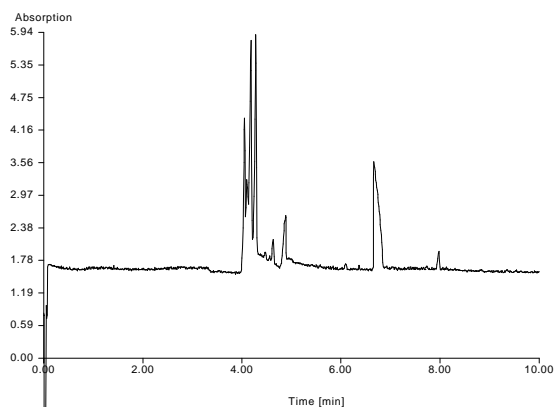


Abb. 4.32: 15 mM Heptakis-(2,6-di-O-methyl)- β -CD

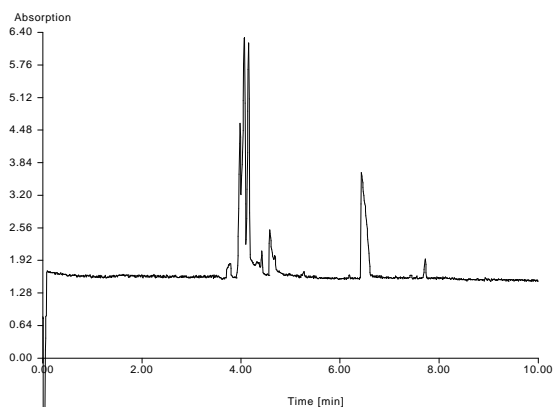


Abb. 4.33: 15 mM Hydroxypropyl- β -CD

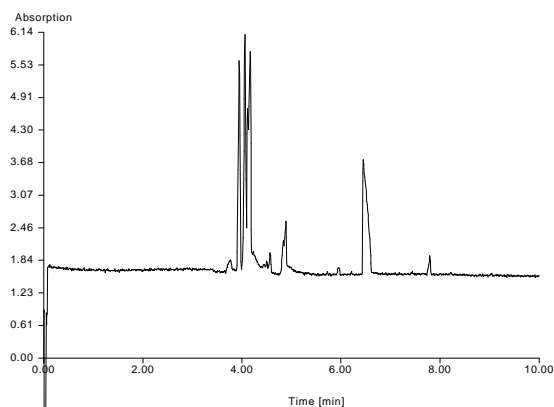


Abb. 4.34: 15 mM β -CD

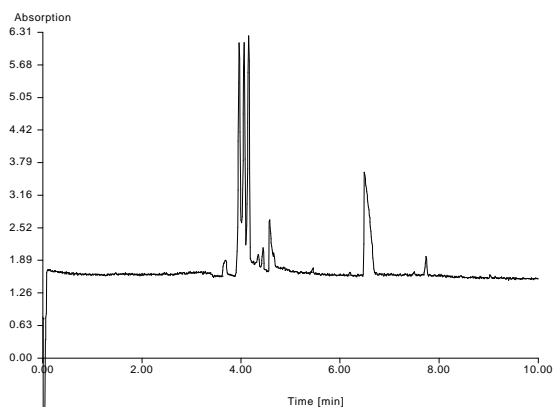


Abb. 4.35: 15 mM Methyl- β -CD

(bei allen 4 Abbildungen sonstige Bedingungen wie in Abb. 4.11)

4.4.8 Natriumtetraborat-SDS / Ethylenglykol

Zur Viskositätserhöhung kann u. a. Ethylenglykol (EG) eingesetzt werden [9]. Im Falle von Taurolidin scheint sich mit steigenden EG-Konzentrationen eine Verbesserung der Trennung von Tarultam / Taurinamid abzuzeichnen (am besten bei 20 – 25 % EG), bei EG-Konzentrationen ab 30 % werden die Elektropherogramme jedoch unbrauchbar. Wie an dem letzten Elektropherogramm dargestellt, ist einer der Peaks bei höheren EG-Konzentrationen ein Systempeak (Abb. 4.40 und 4.41). Darüber hinaus wird das System relativ instabil, was sich in starken Schwankungen der Migrationszeiten äußert (Abb. 4.36 bis 4.39).

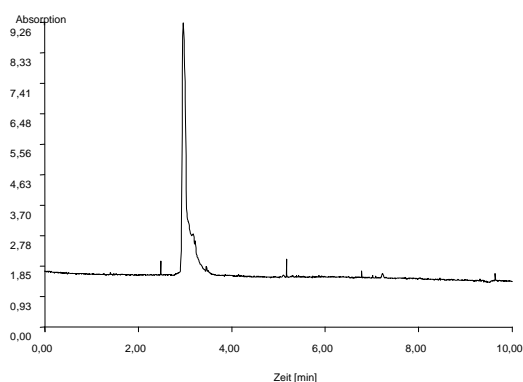


Abb. 4.36: Ohne EG

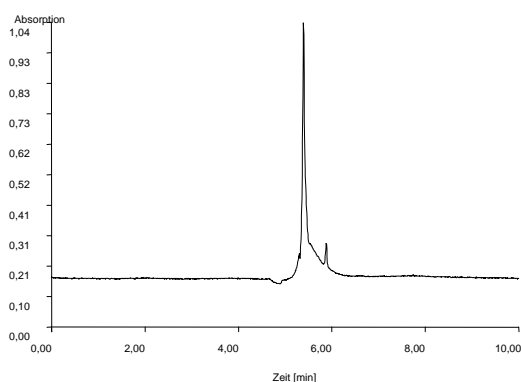


Abb. 4.37: 10 % EG

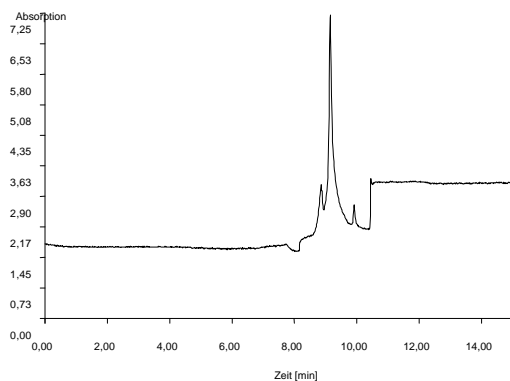


Abb. 4.38: 20 % EG

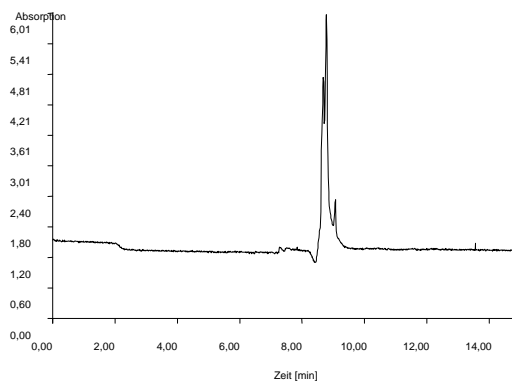


Abb. 4.39: 25 % EG

(Abb. 4.36 bis 4.39: Sonstige Bedingungen wie in Abb. 4.11)

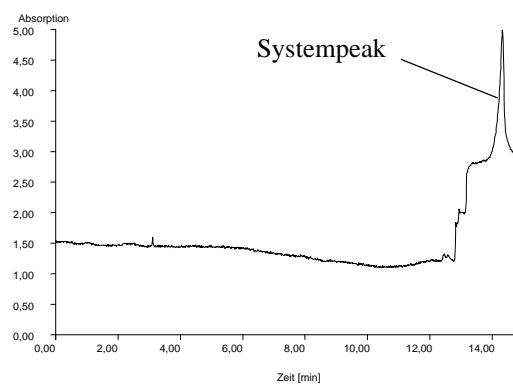
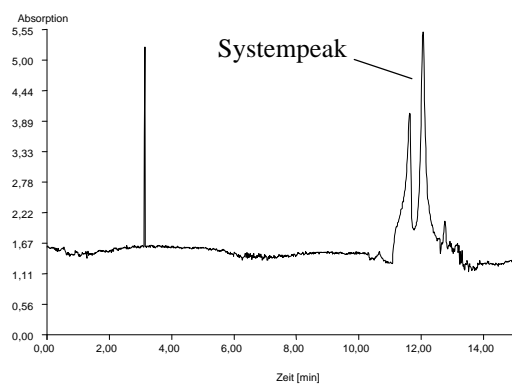


Abb. 4.40: 30 % EG Abb. 4.41: Injektion von Wasser bei Verwendung eines 30 % EG-Puffer
(Abb. 4.36 bis 4.41: Sonstige Bedingungen wie in Abb. 4.11)

4.4.9 Natriumtetraborat-Puffer mit unterschiedlichen SDS-Konzentrationen

Wegen der sich bei verschiedenen SDS-Konzentrationen verändernden Selektivität wurde auch die Änderung der SDS-Konzentration im Laufpuffer als eine Möglichkeit zur Verbesserung der Selektivität in Betracht gezogen. Dazu wurden Puffer mit 100 mM Natriumtetraborat jeweils mit 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 und 200 mM SDS versetzt. Zu jeder Konzentration (bis einschl. 175 mM) soll hier ein Beispielelektropherogramm zusammen mit der jeweiligen Auflösung des Peakpaares (ab 50 mM SDS) Taurultam-Taurinamid gezeigt werden (als Auslaßpuffer wurde hier immer Puffer ohne SDS-Zusatz verwendet, Abb. 4.42 bis 4.49). Die Pfeile zeigen dabei jeweils auf die zu Taurultum und Taurinamid gehörigen Peaks im Elektropherogramm mit der niedrigsten (Abb. 4.44) und der höchsten Auflösung (Abb. 4.47).

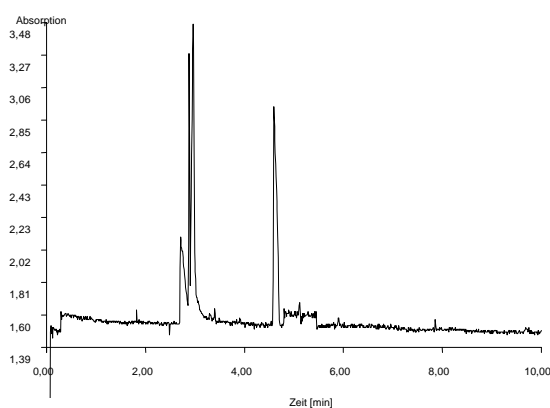


Abb. 4.42: Ohne SDS-Zusatz

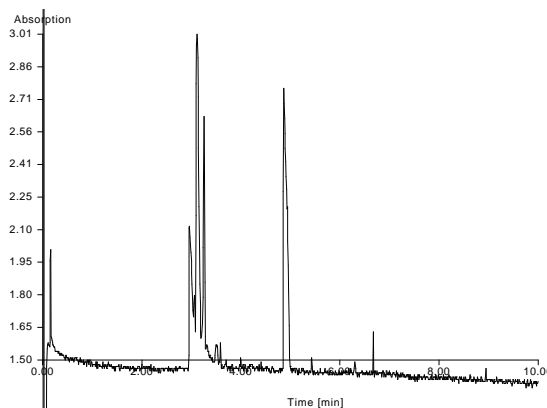


Abb. 4.43: 25 mM SDS

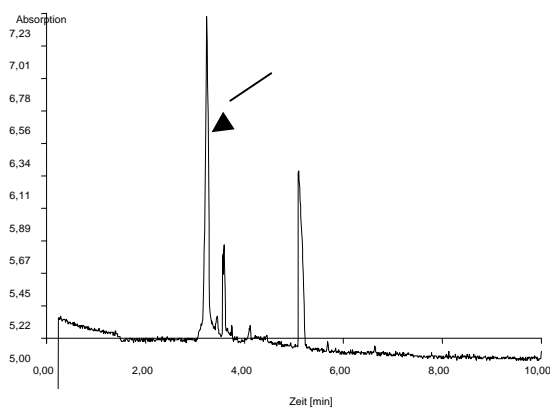


Abb. 4.44: 50 mM SDS ($R' = 0$)

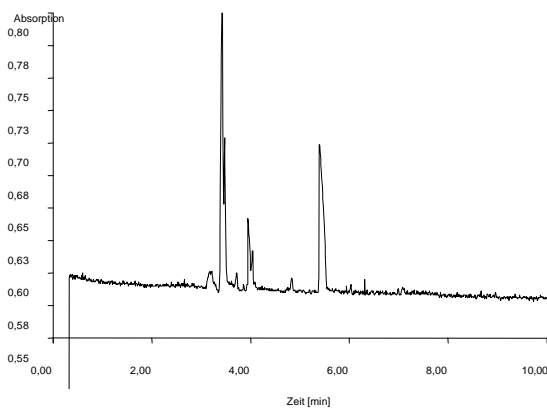


Abb. 4.45: 75 mM SDS ($R' \approx 73\%$)

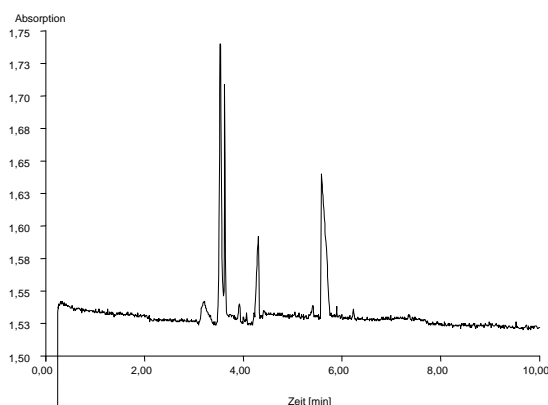


Abb. 4.46: 100 mM SDS ($R' \approx 91\%$)

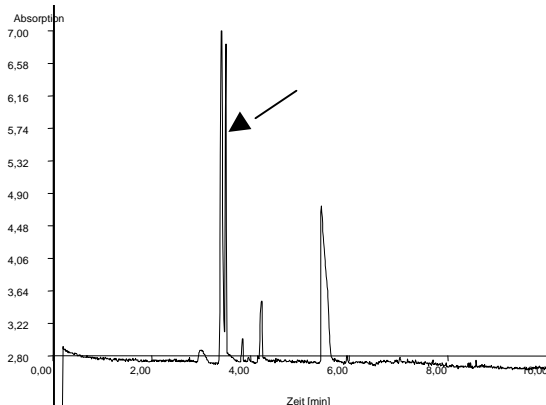


Abb. 4.47: 125 mM SDS ($R' \approx 92\%$)

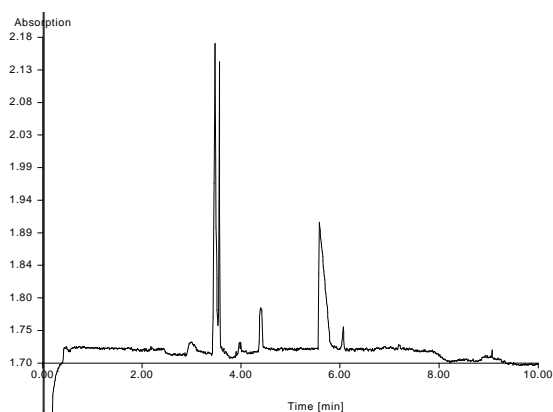


Abb. 4.48: 150 mM SDS ($R' \approx 90\%$)

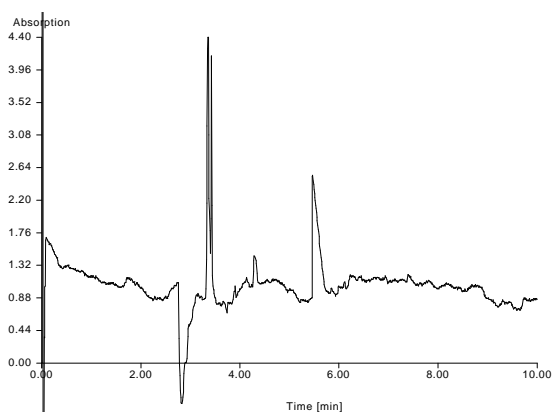


Abb. 4.49: 175 mM SDS ($R' \approx 84\%$)

(Abb. 4.45 bis 4.52: Sonstige Bedingungen wie in Abb. 4.11)

Bei niedrigen SDS-Konzentrationen ergibt sich ein völlig anderes Peakmuster als bei der üblicherweise verwendeten Konzentration von 100 mM. Deshalb konnte hier auch die

Auflösung ($R' = \frac{H - H'}{H}$, mit H: Höhe des ersten Peaks, H' : Höhe des Tales zwischen den

beiden Peaks, vgl. Kap. 1.2.4.3) zwischen Taurultam und Taurinamid nicht bestimmt werden.

Bei einer Zugabe von 50 mM SDS zum Laufpuffer laufen diese beiden Peaks gerade zusammen ($R' = 0$, Abb. 4.44). Eine Konzentration von 125 mM SDS im Laufpuffer führt zu der besten Auflösung (92 %, Abb. 4.47); diese geht jedoch bei Zusatz von noch mehr SDS wieder zurück, und ab einer Konzentration von 175 mM SDS kommt es zu starken Schwankungen der Basislinie, eine genaue Bestimmung von R' ist nicht mehr möglich. Auch hier treten negative Systempeaks auf (vgl. 4.4.6).

4.5 Trennungen von Tauroldin unter Zusatz anderer Mizellbildner als SDS

Um eine weitere Veränderung der Selektivität zu erzielen, werden dem Borat/SDS-Puffer andere, nichtionische Mizellbildner zum Zweck der Bildung gemischter Mizellen zugesetzt (Brij 35 P, Triton X-100, Tween 20, Kap. 4.5.1 bis 4.5.3, vgl. Tab. 4.1), andererseits werden auch Versuche unter vollständigem Ersatz von SDS durch anionische Mizellbildner (LiPFOS, Cholsäure, Deoxycholsäure, Kap. 4.5.4 bis 4.5.6) durchgeführt. In einem Artikel von D. Corradini [57] wird eine Übersicht mehrerer möglicher Pufferzusätze unter besonderer Berücksichtigung von Proteintrennungen gegeben.

4.5.1 Brij 35 P

Durch Zusatz von 25 mM Brij 35 P (ein nichtionisches Tensid, s. Tab. 4.1) zum Boratpuffer wurde überhaupt keine Trennung erreicht, es ist nur ein Peak beobachtbar (Abb. 4.50 und 4.51).

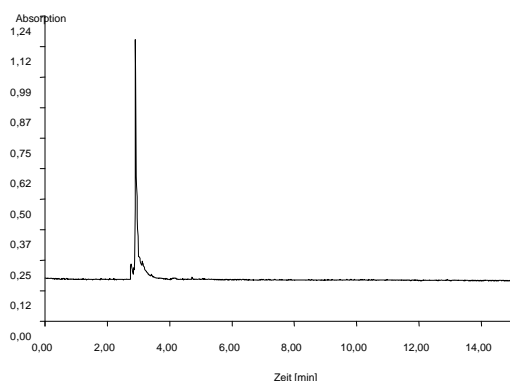


Abb. 4.50: 25 mM Brij 35 P, ohne SDS

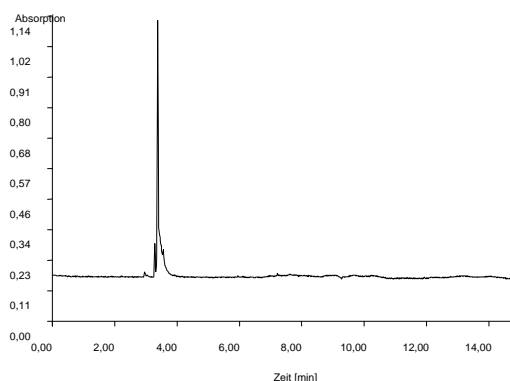


Abb. 4.51: 25 mM Brij 35 P, 100 mM SDS

(Mischung wie in Abb. 4.11)

4.5.2 Triton X-100

Durch den Zusatz von Triton X-100 (ein nichtionisches Tensid, s. Tab. 4.1) erhält man sehr stark verrauschte Elektropherogramme, so daß dieser Zusatz hier als nicht geeignet angesehen werden muß (Abb. 4.52).

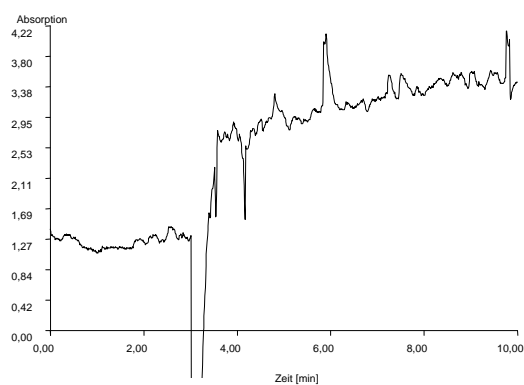


Abb. 4.52: 100 mM SDS, 1,7 % Triton X-100
(Mischung wie in Abb. 4.11)

4.5.3 Tween 20

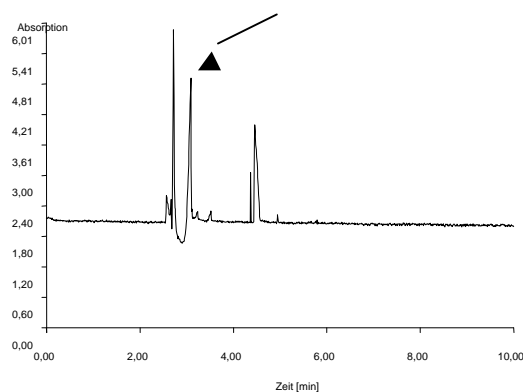


Abb. 4.53: 100 mM SDS, 1 % Tween 20

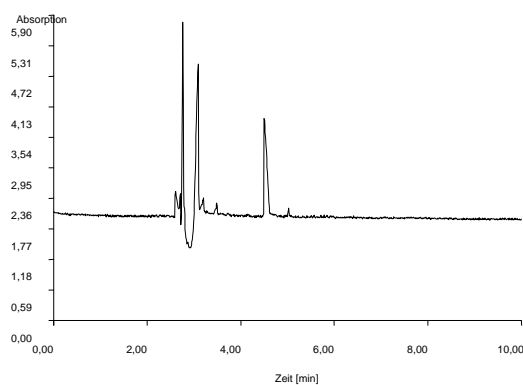


Abb. 4.54: 100 mM SDS, 2 % Tween 20

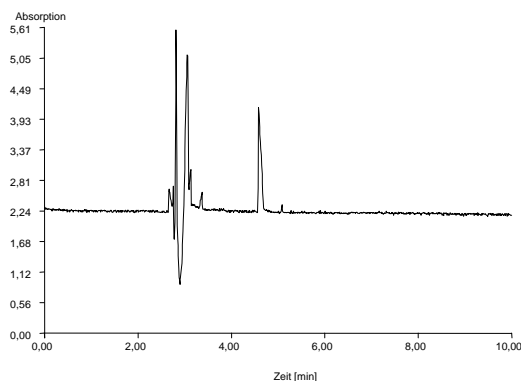


Abb. 4.55: 100 mM SDS, 3 % Tween 20

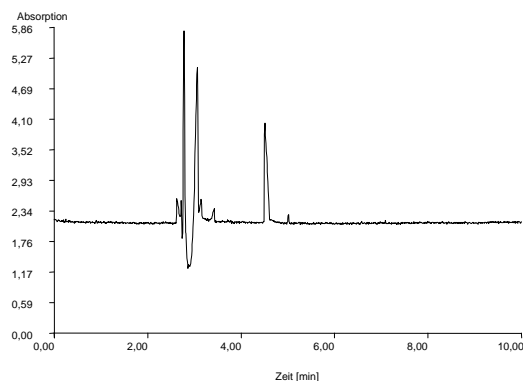


Abb. 4.56: 100 mM SDS, 4 % Tween 20

(Abb. 4.53 bis 4.56: Mischung wie in Abb. 4.11)

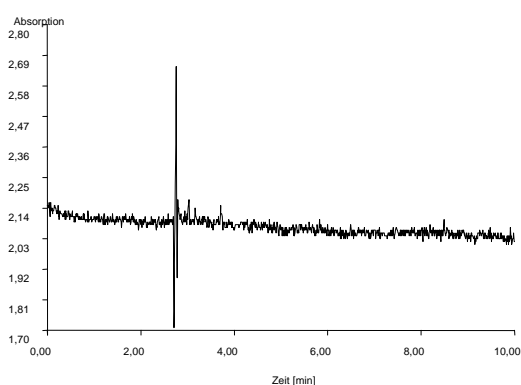


Abb. 4.57: Acetanilid, Puffer mit 100 mM SDS und 4 % Tween

Mit einem aus je 100 mM Natriumtetraborat und Natriumlaurylsulfat (SDS) sowie 1 – 4 % Tween 20 (ein nichtionisches Tensid, vgl. Tab. 4.1) bestehenden Puffer können recht gute Ergebnisse erzielt werden, zwischen Taurultam und Taurinamid wird Basislinientrennung erreicht (Abb. 4.53 bis 4.57). Von den beiden großen Peaks zwischen 2 und 4 Minuten ist, wie aus dem Vergleichselektropherogramm mit Acetanilid hervorgeht, keiner ein Systempeak. Durch den Störpeak bei ca. 2,5 min, der eine quantitative Auswertung der oben erwähnten Substanzen verhindert, bietet diese Methode jedoch keinen Vorteil gegenüber der in 4.4.1 vorgestellten.

4.5.4 Lithiumperfluorooctansulfonat (LiPFOS)

Neben SDS, dem in der MEKC am meisten verwendeten Tensid, gibt es noch andere anionische Tenside, welche als Mizellbildner eingesetzt werden. In der MEKC finden hauptsächlich verschiedene Gallensäuren (s. Kap. 4.5.5 und 4.5.6) sowie perfluorierte Alkylsulfonate (hier: LiPFOS, Kap. 4.5.4) Verwendung [9]. Allerdings stellt sich bei dem Versuch, LiPFOS in einem Natriumsalz zu lösen (z. B. Natriumtetraborat) entgegen entsprechenden Literaturangaben heraus, daß LiPFOS unter diesen Bedingungen unlöslich ist [58]. Daher werden die Versuche mit einem mit Lithiumhydroxid eingestellten Boratpuffer (100 mM Borsäure, mit LiOH eingestellt auf pH = 7,2) durchgeführt, von denen hier einige Elektropherogramme dargestellt sind (Abb. 4.58 bis 4.63).

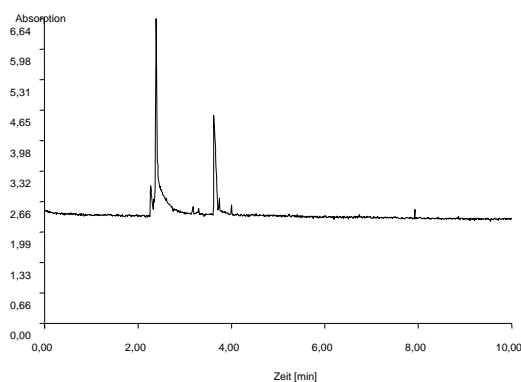


Abb. 4.58: Ohne LiPFOS

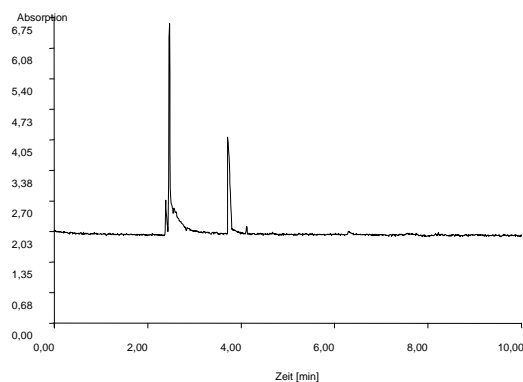


Abb. 4.59: 10 mM LiPFOS

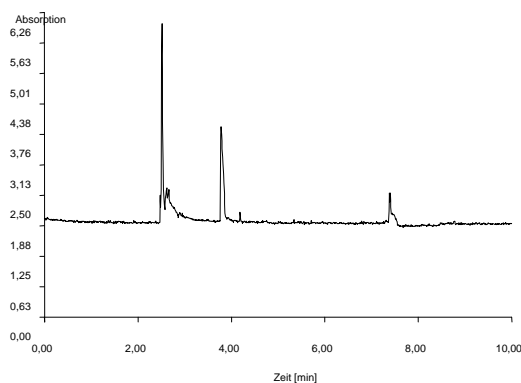


Abb. 4.60: 20 mM LiPFOS

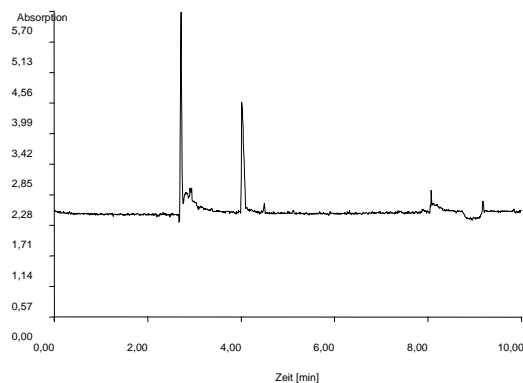


Abb. 4.61: 30 mM LiPFOS

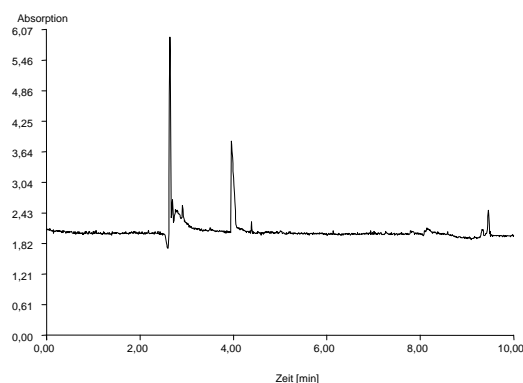


Abb. 4.62: 40 mM LiPFOS

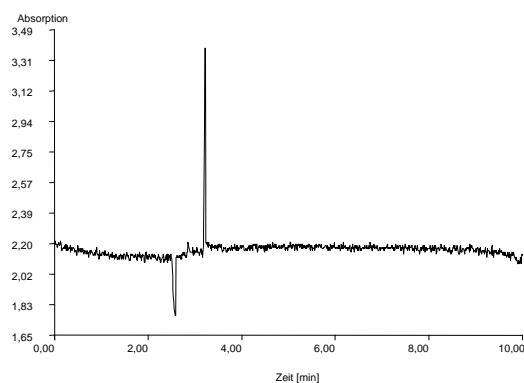


Abb. 4.63: Acetanilid, 40 mM LiPFOS

(Abb. 4.58 bis 4.62: Mischung wie in Abb. 4.11)

Hier wird Verbesserung der Auflösung des Peakpaares Taurultam / Taurinamid sichtbar. Die Elektropherogramme ähneln alle dem Elektropherogramm ohne Zusatz eines Mizellbildners (vgl. Abb. 4.5). Wie ein Vergleich mit einer methanolischen Acetanilid-Lösung zeigt, liegt der Taurultam-Peak, praktisch zusammen mit dem Taurinamid-Peak, an der Stelle des EOF (bei 40 mM LiPFOS ca. 2,5 min).

4.5.5 Cholsäure

Unter Zusatz von Cholsäure (Natriumsalz) wird eine geringfügige Verbesserung der Selektivität beobachtet. Bei Konzentrationen über 20 mM können die Läufe jedoch nicht mehr verwendet werden, wie an den starken Störungen der Basislinie in Abb. 4.72 erkennbar wird (Abb. 4.64 bis 4.69).

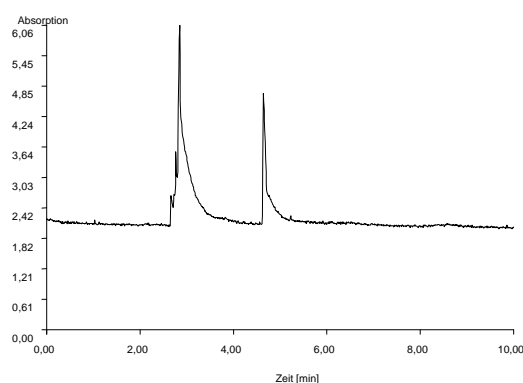


Abb. 4.64: ohne Cholat

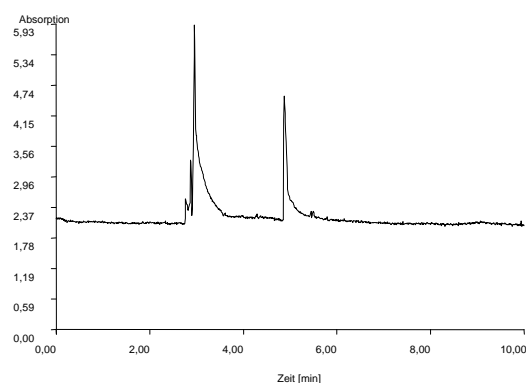


Abb. 4.65: 5 mM Cholat

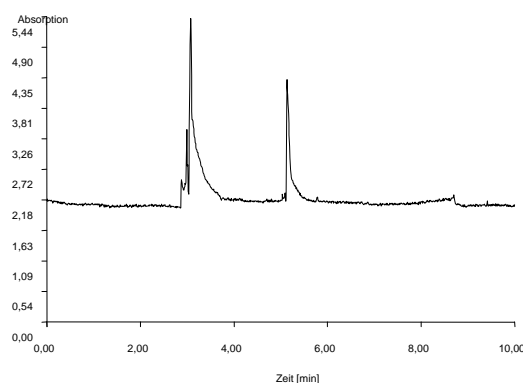


Abb. 4.66: 10 mM Cholat

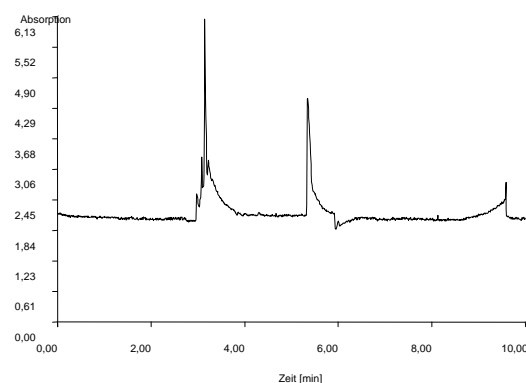


Abb. 4.67: 15 mM Cholat

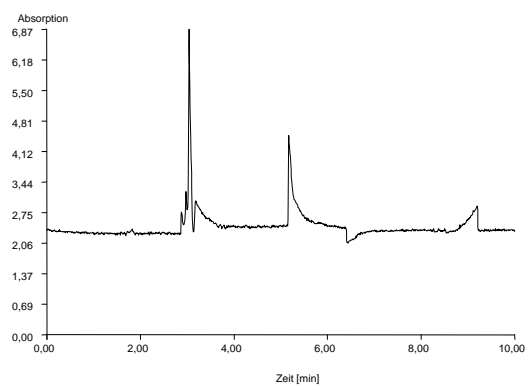


Abb. 4.68: 20 mM Cholat

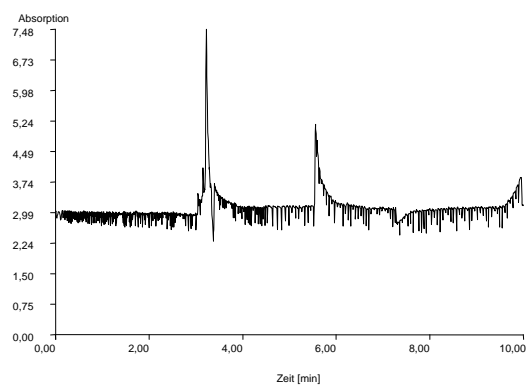


Abb. 4.69: 25 mM Cholat

(Abb. 4.64 bis 4.69: Mischung wie in Abb. 4.11)

Zusätzlich werden auch Läufe mit einer Mischung aus Natriumcholat und SDS durchgeführt, bei denen gegenüber Abb. 4.67 und 4.68 keine Verbesserung beobachtet werden kann (Abb. 4.70 und 4.71).

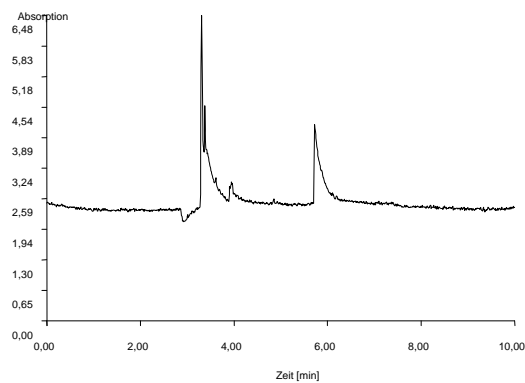


Abb. 4.70: 15 mM Cholat, 100 mM SDS

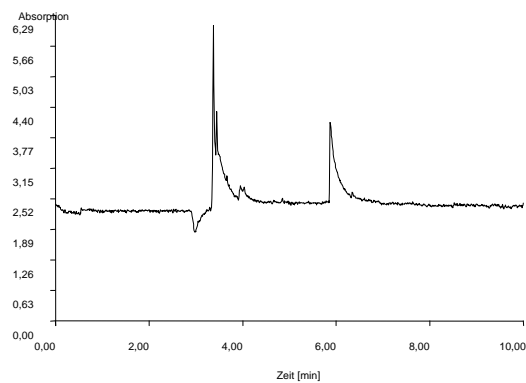


Abb. 4.71: 20 mM Cholat, 100 mM SDS

(Mischung wie in Abb. 4.11)

4.5.6 Deoxycholsäure

Weiter werden Versuche mit Deoxycholsäure (Natriumsalz) durchgeführt (Abb. 4.72 und 4.73).

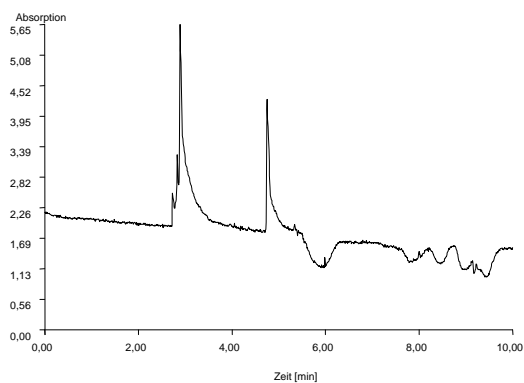


Abb. 4.72: 5 mM Deoxycholat

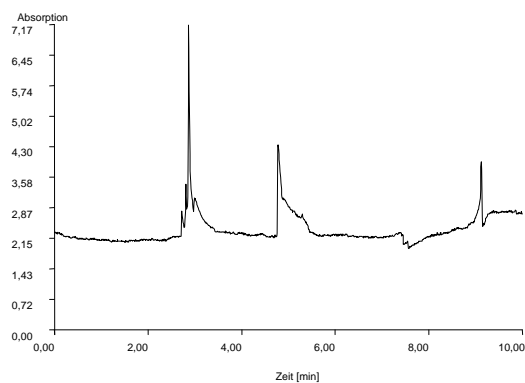
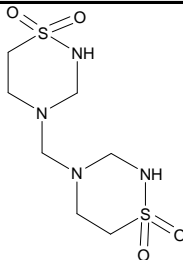
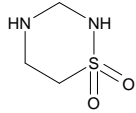
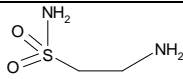
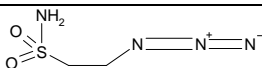
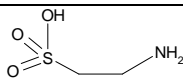
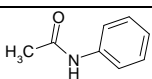
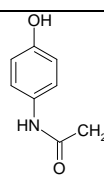


Abb. 4.73: 10 mM Deoxycholat

(Mischung wie in Abb. 4.11)

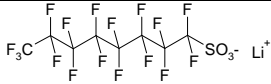
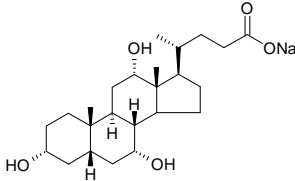
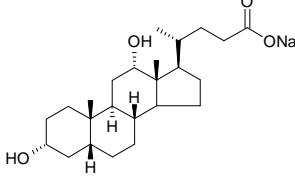
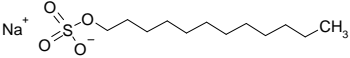
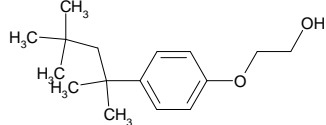
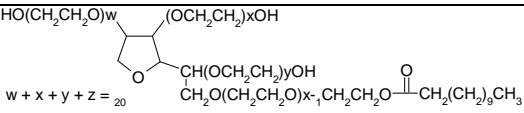
Da die Elektropherogramme mit höherer Deoxycholat-Konzentration immer schlechter werden, wird dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

4.6 Verwendete Substanzen

Substanz [CAS-Nr.]	Formel	t_M (Kurze Kapillare ² , ohne Formaldehyd)
Taurolidin [19388-87-5]		2,5 min.
Taurultam [38668-01-8]		2,5 min.
Taurinamid [4378-70-5]		3 min.
Taurylazid		3,5 min.
Taurin [107-35-7]		4,2 min.
Acetanilid [103-84-4]		—
Paracetamol [103-90-2]		—

Tab. 4.1a: Strukturformeln und Migrationszeiten der verwendeten Substanzen (vgl. Abb. 4.6 bis 4.11)

² L = 25 cm, s. Kap. 4.4.1

Substanz [CAS-Nr.]	Formel
Anionische Tenside	
LiPFOS [29457-72-5]	
Natriumcholat [361-09-1]	
Natriumdeoxycholat [302-95-4]	
SDS [151-21-3]	
Nichtionische Tenside	
Brij 35 P [9002-92-0]	$C_{12}H_{25}(OCH_2CH_2)_nOH$ $n \approx 23$
Triton X-100 [9002-93-1]	
Tween 20 [9005-64-5]	

Tab. 4.1b: Strukturformeln der verwendeten Substanzen (Tenside)

4.7 Tabellarische Darstellung der Ergebnisse

In Tab. 4.2 werden die Ergebnisse aus Kap. 4.3 bis 4.5 tabellarisch zusammengefasst.

Puffer [4]	pH	Beobachtungen
Ohne Zusätze bzw. mit unterschiedlichen SDS ^a -Konzentrationen (Kap. 4.3 und 4.4)		
Phosphatpuffer	6,0	Keine Trennung Substanzen 2/3 (Abb. 4.5)
Borat – SDS ^a	9,2	Ohne SDS ^a Selektivität sehr schlecht, Optimum bei 125 mM SDS ^a (Abb. 4.6 – 4.11 und 4.42 – 4.49)
Borat – SDS ^a , U < 30 kV	9,2	Längere Migrationszeiten (Abb. 4.12 – 4.14)
Borat – SDS ^a	< 9	Längere Migrationszeiten (Abb. 4.15 und 4.16)
Pufferzusatz [56-58, 79]	Beobachtungen	
Boratpuffer mit 100 mM SDS + andere Zusätze (Kap. 4.4)		
Formaldehyd	Nicht auswertbare E-Gramme (Abb. 4.17 – 4.19)	
Acetonitril	Verschlechterung der Auflösung 2/3 (Abb. 4.20 – 4.25)	
1-Hexanol	Verschlechterung der Auflösung 2/3 (Abb. 4.26 – 4.28)	
Harnstoff	Bessere Auflösung 2/3, aber zusätzliche Systempeaks (Abb. 4.29 – 4.31)	
15 mM Cyclodextrin ^C	Nicht auswertbare E-Gramme (Abb. 4.32 – 4.35)	
Ethylenglykol (EG)	Leichte Verbesserung der Auflösung 2/3 bei 20 – 25 % (Abb. 4.36 – 4.41)	
Boratpuffer + andere Mizellbildner als SDS (Kap. 4.5)		
25 mM Brij 35 ⁿ (+ 100 mM SDS ^a)	Keine Trennung 2/3 (Abb. 4.50 und 4.51)	
Triton X-100 ⁿ	Ungeeignet (Abb. 4.52)	
Tween 20 ⁿ – 100 mM SDS ^a	Basislinientrennung 2/3, aber Störpeak (Abb. 4.53 – 4.57)	
LiPFOS ^a	Schlechter als mit SDS ^a (Abb. 4.58 – 4.63)	
Na-cholat ^a (+ 100 mM SDS ^a)	Schlechter als mit SDS ^a (Abb. 4.64 – 4.71)	
Na-deoxycholat ^a	Schlechter als mit SDS ^a (Abb. 4.72 und 4.73)	

Tabelle 4.2: Zusammenfassung der Ergebnisse aus Kap. 4.3 – 4.5

Substanz 2: Taurultam Substanz 3: Taurinamid

^a: Anionische Tenside ⁿ: Nichtionische Tenside

^c: β- / Methyl-β- / Hydroxypropyl-β- / Heptakis-(2,6-di-O-methyl)-β-Cyclodextrin

4.8 Diskussion

Die Selektivität des in Kapitel 4.4.1 vorgestellten Systems kann nicht mehr wesentlich verbessert werden, da sich Taurultam und Taurinamid in ihren physikochemischen Eigenschaften zu ähnlich sind. Somit ist die bisher beste Methode zur Qualitätskontrolle von Taurolidin die in Kap. 4.4.1 vorgestellte. Verwendet wird dabei ein Boratpuffer der Konzentration 100 mM, pH = 9,2, mit einem Zusatz von 100 mM SDS. In den unter [49-52] zitierten Artikeln werden zwar auch Methoden vorgestellt, welche teilweise ähnliche Ergebnisse liefern, jedoch ist dort der Aufwand wesentlich höher. In [52] kann Taurultam getrennt von Taurinamid bestimmt werden, allerdings ist dabei einerseits der viel höhere Aufwand für die Derivatisierung der Analyten, andererseits der hohe Verbrauch an Fließmittel (verwendet wird Methanol bei einer Flußrate von 1,75 ml/min) in Betracht zu ziehen. Falls eine quantitative Bestimmung von Taurultam neben Taurinamid mit hoher Präzision erforderlich sein sollte, kann eine zweidimensionale Trenntechnik wie z. B. LC-MS oder CE-MS eingesetzt werden. Dadurch werden allerdings u. a. durch den erhöhten gerätetechnischen Aufwand zusätzliche Kosten verursacht.

5 Trennung von Enantiomeren

Die allgemeine Methode für chirale Trennungen wird in Kap. 1.2.5 beschrieben. Untersucht werden Tramadol-ähnliche Substanzen (Kap. 5.1), ein Prolin-Derivat (Kap. 5.2) sowie verschiedene Aminosäuren (Kap. 5.3).

5.1 Trennung von Tramadol-ähnlichen¹ Substanzen

5.1.1 Bedeutung von Tramadol

Tramadol (CAS-Nr. [27203-92-5]) ist ein häufig eingesetztes Opioid, welches bei mäßig starken bis starken Schmerzen angewandt wird. Im Vergleich zu anderen Opioiden besitzt Tramadol den Vorteil, daß es eine geringere dämpfende Wirkung auf das Atemzentrum ausübt und ein geringeres Suchtpotential aufweist, dagegen ist die schmerzlindernde Wirkung geringer und läßt schnell nach [59].

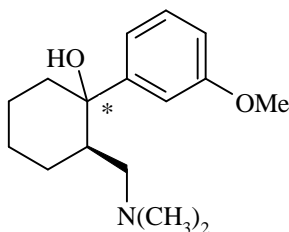


Abb. 5.1: Tramadol

¹ Strukturen unbekannt

5.1.2 Trennung von Tramadol und drei unbekannten Derivaten in ihre Enantiomere

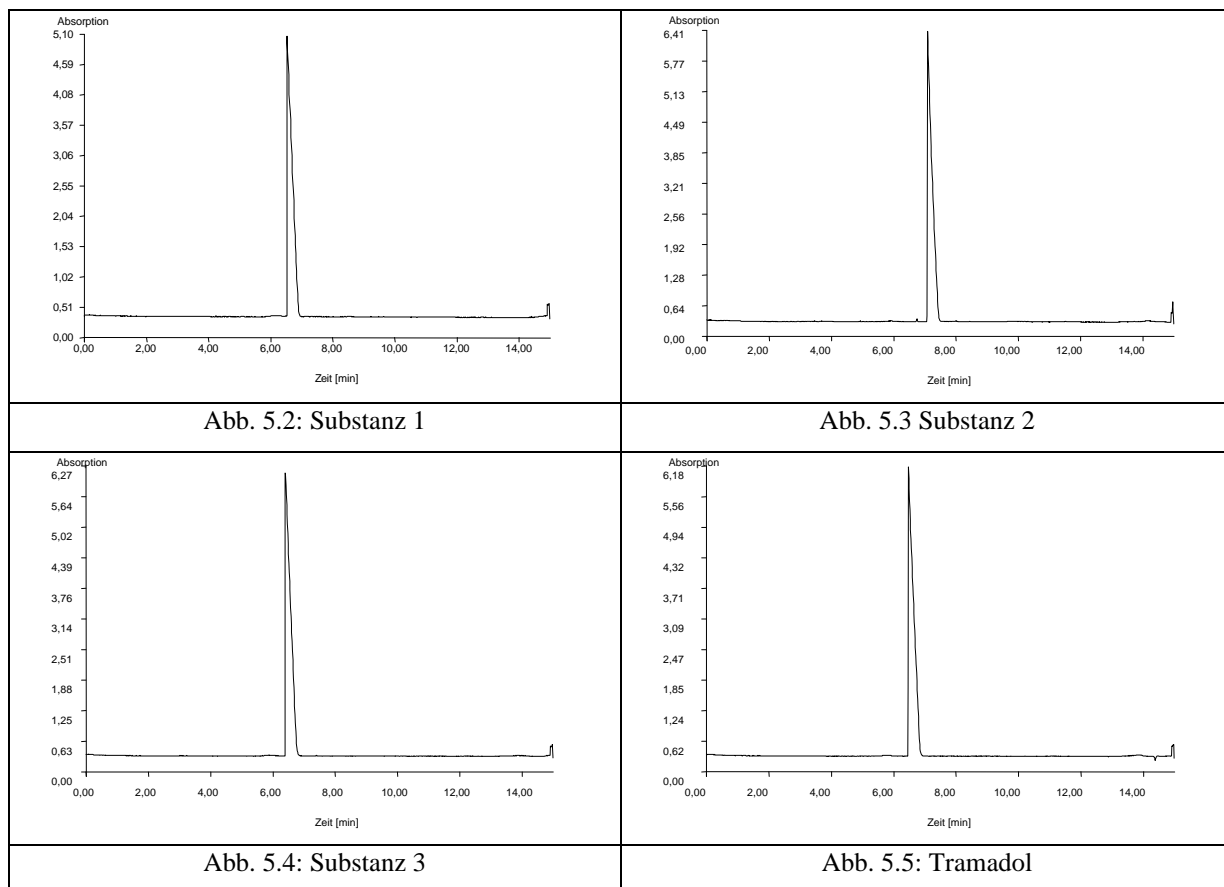
Zunächst werden einige Läufe ohne Zusatz eines chiralen Detektors mit einem Phosphatpuffer 50 mM, pH = 2,5, U = 25 kV durchgeführt ($\lambda = 200$ nm). Verwendet wird das Gerät SpectraPhoresis 1000 (s. Kap. 10.1), der Kapillarinne Durchmesser beträgt 50 μm bei einer Kapillarlänge von 42 cm (35 cm zum Detektor). Die Migrationszeiten der einzelnen Substanzen werden im folgenden tabellarisch aufgeführt:

Substanz	Zeit [min]
1	6,6
2	7,3
3	6,4
Tramadol	6,5

Tab. 5.1: Migrationszeiten der Tramadol-Derivate

Wie aus der Tabelle ersichtlich, besitzen die drei unbekannten Tramadol-Derivate erwartungsgemäß ein ähnliches Verhalten unter kapillarelektrophoretischen Bedingungen.

Die dazugehörigen Elektropherogramme sollen in der Übersicht (Abb. 5.2 bis 5.5) kurz vorgestellt werden:



Für Tramadol gibt es in der Literatur bereits Trennungen [60-63]. Bei einer Publikation wurden folgende Bedingungen verwendet (Puffer nach Chan) [64]:

50 mM Phosphat, pH = 2,5

(1,7011 g Kalium-
dihydrogenphosphat
auf 250 ml Wasser)

75 mM Methyl- β -Cyclodextrin (Substitutionsgrad = 1,8) (0,9836 g auf 10 ml Puffer)

220 mM Harnstoff

(0,1201 g auf 10 ml Puffer)

0,05 Gew.% (Hydroxypropyl)-methylcellulose

(0,005 g auf 10 ml Puffer)

Temperatur:

15°C

Injektion:

5 kV, 6 s (elektrokinetisch)

Trennungsspannung:

25 kV

Kapillare:

50 cm x 50 μ m, LPA²-beschichtet

Wellenlänge:

200 / 272 nm

Um nun die chiralen Tramadol-Derivate Substanz 1–3 in ihre Enantiomere aufzutrennen, werden mehrere Phosphatpuffer nach obiger Vorschrift, jedoch mit anderen Cyclodextrinen hergestellt. Den Pufferlösungen (Phosphatpuffer 50 mM, pH = 2,5) werden dabei jeweils 10 mM β -Cyclodextrin, Methyl- β -Cyclodextrin, Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin oder Heptakis-(2,6-di-O-Methyl)- β -Cyclodextrin zugesetzt. Für den modifizierten Puffer nach Chan [64] wird statt der (Hydroxypropyl)-methylcellulose Hydroxyethyl-cellulose verwendet. In allen Fällen kommen unbeschichtete Kieselglaskapillaren zur Anwendung. Wie erwartet hat die Senkung der Injektionszeit von 6 auf 0,6 Sekunden (bei 1 kV; unbekannte Konzentration der Probelösungen³) eine Verbesserung der Trennleistung zur Folge. Für die Substanz 1 kann durch Zusatz von Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin eine Antrennung erreicht werden (Abb. 5.6):

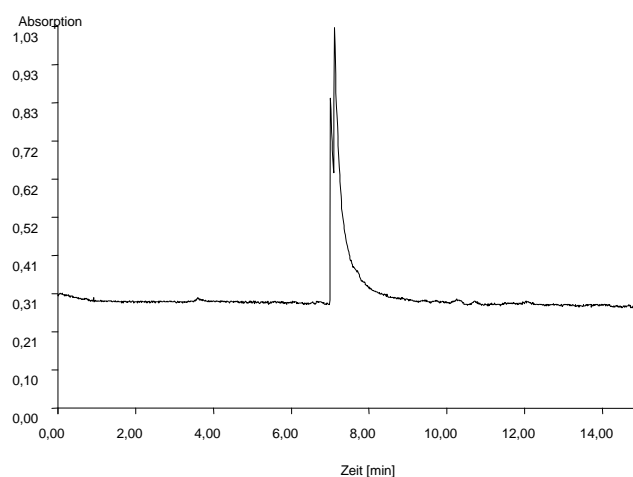


Abb. 5.6: Substanz 1

Phosphatpuffer pH 2,5 mit 10 mM Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin

Die Substanz 2 kann durch einen Puffer mit Heptakis-(2,6-di-O-Methyl)- β -Cyclodextrin, die Substanz 3 sowohl durch Zusatz von Heptakis-(2,6-di-O-Methyl)- β -Cyclodextrin als auch durch den Puffer nach Chan vollständig in die jeweiligen Enantiomere getrennt werden (Abb. 5.7 bis 5.9):

² Lineares Polyacrylamid

³ Die gelösten Substanzen wurden von einem Tagungsteilnehmer zur Verfügung gestellt

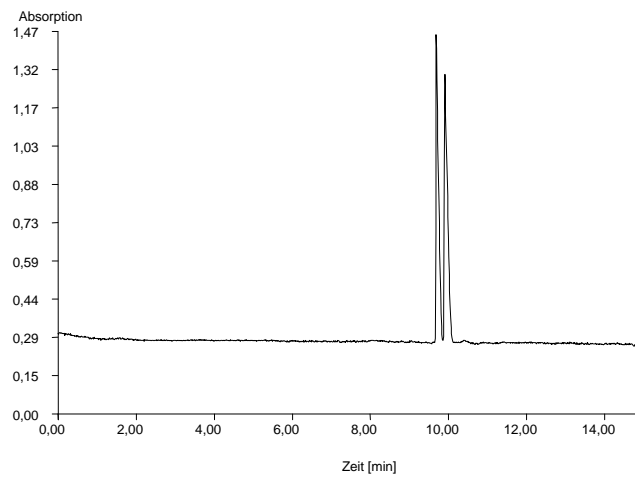


Abb. 5.7: Substanz 2

Phosphatpuffer pH 2,5 mit 10 mM Heptakis-(2,6-di-O-Methyl)- β -Cyclodextrin

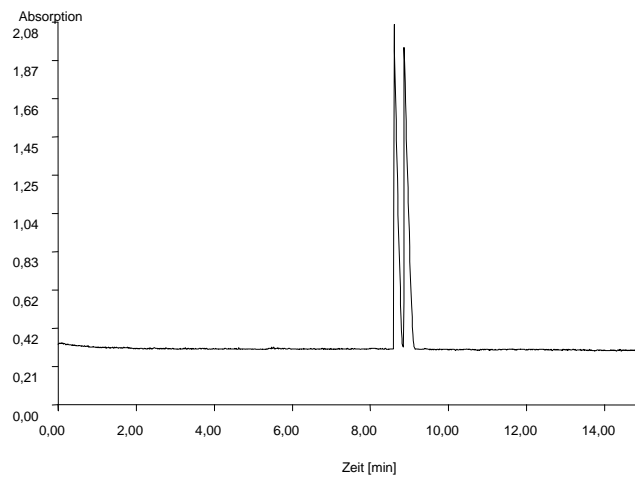


Abb. 5.8: Substanz 3

Phosphatpuffer pH 2,5 mit 10 mM Heptakis-(2,6-di-O-Methyl)- β -Cyclodextrin

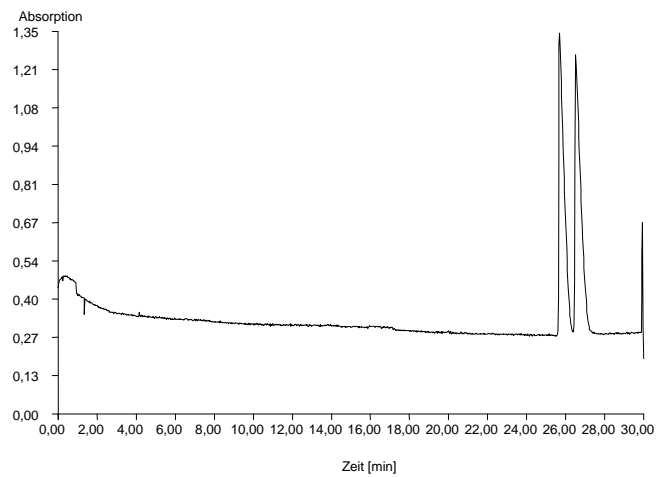


Abb. 5.9: Substanz 3

Modifizierter Puffer nach Chan (s. S. 86 / 87)

Bei Tramadol selbst wird mit dem Puffer nach Chan eine gute Antrennung erreicht (Abb. 5.10):

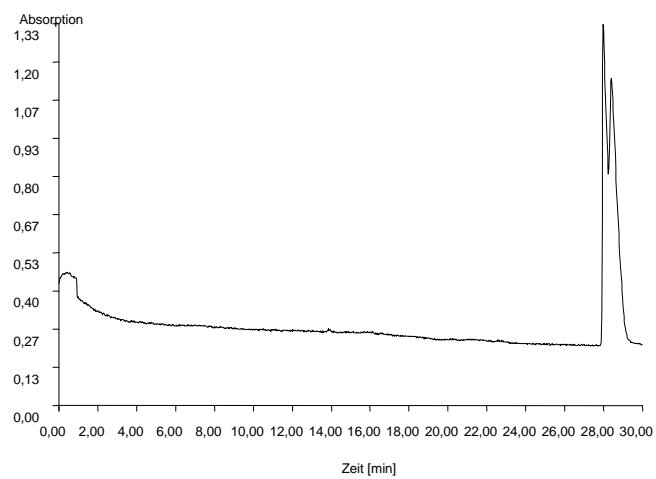


Abb. 5.10: Tramadol

Modifizierter Puffer nach Chan (s. S. 86 / 87)

Nachfolgend eine Zusammenfassung der Ergebnisse in tabellarischer Form:

Substanz \ Puffer	CD	M	HP	VII	Chan
1	12 %	13 %	39 %	0 %	22 %
2	0 %	0 %	0 %	100 %	0 %
3	28 %	32 %	26 %	100 %	100 %
Tramadol	0 %	3 %	0 %	0 %	46 %

Tab. 5.2

Die Prozentzahlen geben den ungefähren Auflösungsfaktor R' wieder ($R' = 100 \cdot [(H-H') / H]$, vgl. Kap. 1.2.4.3)

Abkürzungen: CD: β -Cyclodextrin M: Methyl- β -CD HP: Hydroxypropyl- β -CD

VII: Heptakis-(2,6-di-O-Methyl)- β -CD

Chan: Puffer nach Chan mit CD, Harnstoff und Cellulose (leicht modifiziert) [64]

In diesem Abschnitt konnte gezeigt werden, daß es in vielen Fällen möglich ist, chirale Substanzen durch Standard-Pufferzusätze, in diesem Fall durch verschiedene Cyclodextrine, in ihre Enantiomere zu trennen.

5.2 Versuch der Trennung eines Enantiomerengemisches eines Prolin-Derivats⁴

5.2.1 Eigenschaften von Prolin

Prolin ist eine sekundäre Aminosäure mit dem Molekulargewicht von 115,13 g/mol. Sein pK_{S1} beträgt 1,95, der pK_{S2} ist 10,64 [65].

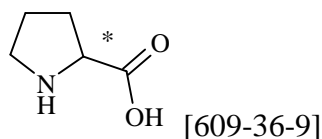


Abb. 5.11: Strukturformel von Prolin

5.2.2 Versuch der Trennung eines Enantiomerengemisches eines Prolin-Derivats

Mit einem Prolin-Derivat werden Versuche zur Trennung in die beiden Enantiomere durchgeführt.

Dazu werden zunächst Puffer folgender Zusammensetzung verwendet [4]:

60 mM Phosphat, pH = 2,5, (565,2 mg KH_2PO_4 + 212,9 mg H_3PO_4 85%
in 250 ml Wasser)

versetzt mit je 10 mM

β -Cyclodextrin (0,1135 g / 10 ml)

Methyl- β -Cyclodextrin (0,1311 g / 10 ml)

Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (0,1331 g / 10 ml)

Heptakis-(2,6-di-O-Methyl)- β -Cyclodextrin (0,1201 g / 10 ml)

8,3 mg Substanz werden in 1 ml mit einem Tropfen 85%iger Phosphorsäure versetztem Wasser gelöst und mit Wasser auf 3 ml verdünnt, was einer Konzentration von ca. 2,9 g / l entspricht.

⁴ Struktur unbekannt

Die Trennung wird unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Spannung:	25 kV
Kapillare:	60 / 45 cm
Innendurchmesser:	50 μ m
Injektion:	0,1 min / 1 kV (elektrokinetisch)
Spülen (1 Bar):	NaOH 0,1 M 1 min
	Wasser 1 min
	Laufpuffer 2 min

Diese Standardvorgehensweise führt in vielen Fällen zu einer Antrennung, woraufhin eine Methodenoptimierung zu einer vollständigen Trennung führt. Mit der vorliegenden Probe ergaben sich jedoch sehr breite, unsymmetrische Peaks (Abb. 5.12):

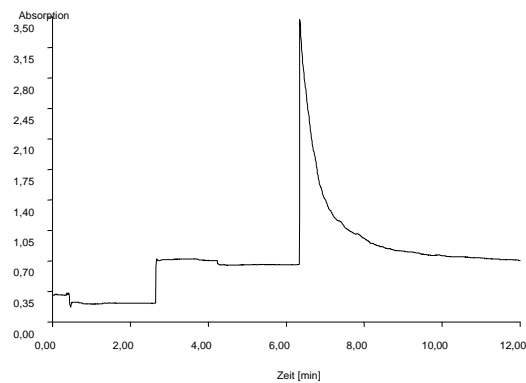


Abb. 5.12: 2,9 g/l Prolin-Derivat
Phosphat-Puffer pH 2,5

Dies kann auf eine Überladung der Kapillare, Adsorption von Probemolekülen an die Kapillarwand oder auf eine falsche Mobilität des Puffer-Gegenions zurückzuführen sein. Als entsprechende Gegenmaßnahme wird eine Erniedrigung der Probenkonzentration (von 2,9 g/l auf 0,29 bzw. 0,029 g/l) und veränderte Injektionsbedingungen (0,02 min / 50 mBar bzw. 0,01 min / 1 kV) gewählt, wodurch einer Überladung der Kapillare entgegengewirkt wird. Um Adsorptionseffekte zu minimieren, kommt eine Erhöhung der Ionenstärke im Puffer, eine Erniedrigung des pH-Wertes sowie die Verwendung eines anderen Puffer-Kations bzw. eines anderen Laufpuffers in Betracht. Durch Zusatz von Kaliumsulfat (250 mM) und Verwendung einer 25 μ m-Kapillare können die Adsorptionseffekte fast vollständig beseitigt werden.

Wegen der hohen Salzkonzentration muß die Spannung zur Vermeidung zu hoher Stromstärken und damit verbundener Wärmeentwicklung auf 15 kV reduziert werden, die Spülzeiten werden wegen der Verwendung einer Kapillare mit kleinerem Innendurchmesser entsprechend verlängert: zunächst wird 2 Minuten mit 0,1 M Natronlauge, dann 2 Minuten mit Wasser und schließlich 4 Minuten mit Laufpuffer gespült.

Diese Bedingungen führen zu schmalen Peaks. Auf dieser Basis kann ein erneuter Versuch erfolgen, eine Enantiomerentrennung durchzuführen (Abb. 5.13):

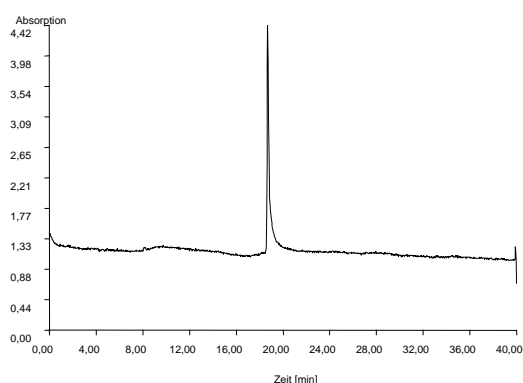


Abb. 5.13: Prolin-Derivat 29 µg/ml, 25 µm-Kapillare
Phosphatpuffer pH 2,5 mit 250 mM Kaliumsulfat

Bei einem Zusatz von nur 10 mM Cyclodextrin konnte keine Antrennung erreicht werden; mit 25 mM Heptakis-(2,6-di-O-methyl)-β-Cyclodextrinpuffer war beim Substanzpeak eine Schulter erkennbar (Abb. 5.14):

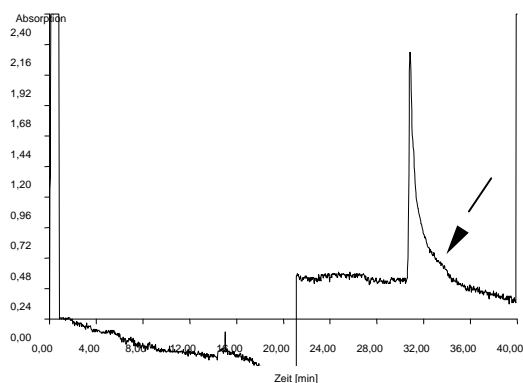


Abb. 5.14: Prolin-Derivat 29 µg/ml, 25 µm-Kapillare

Phosphatpuffer pH 2,5 mit 250 mM Kaliumsulfat und 25 mM Heptakis-(2,6-di-O-methyl)-β-Cyclodextrin

Da bei der hohen Salzkonzentration von 60 mM Phosphat und 250 mM Sulfat jedoch zu hohe Stromstärken auftreten, was teilweise zum Verstopfen der Kapillare führt, wird die

Konzentration an K_2SO_4 auf 200 mM herabgesetzt. Mit 25 mM Methyl- und Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin-Zusatz kann keine Schulter beobachtet werden; β -Cyclodextrin ist in dieser Konzentration nicht mehr löslich. Deswegen wird im weiteren Verlauf Heptakis-(2,6-di-O-methyl)- β -Cyclodextrinpuffer verwendet (Abb. 5.15 und 5.16a/b):

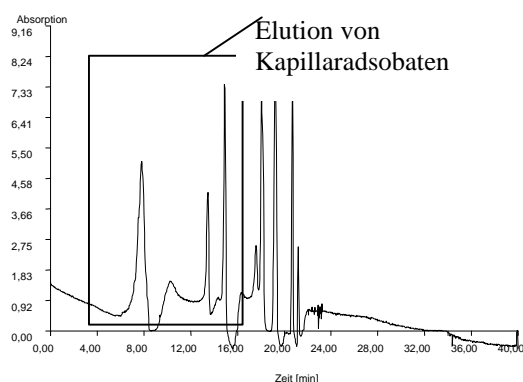


Abb. 5.15 Leerinjektion

Phosphatpuffer pH 2,5 mit 250 mM Kaliumsulfat und 40 mM Heptakis-(2,6-di-O-methyl)- β -Cyclodextrin

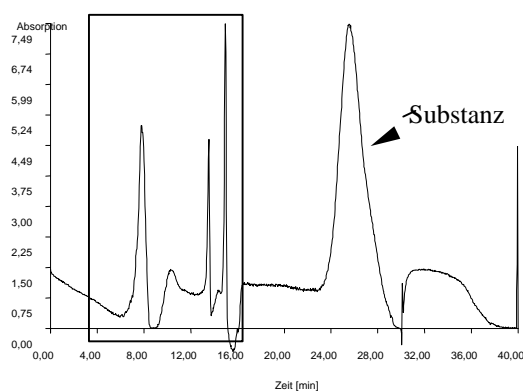


Abb. 5.16a: Prolin-Derivat 29 μ g/ml

Phosphatpuffer pH 2,5 mit 250 mM Kaliumsulfat und 40 mM Heptakis-(2,6-di-O-methyl)- β -Cyclodextrin

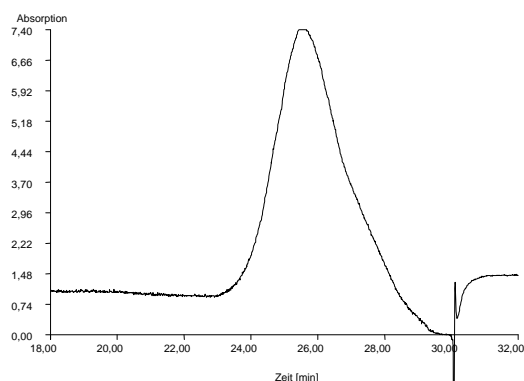


Abb. 5.16b(vergrößerter Ausschnitt aus 5.16a): Prolin-Derivat 29 µg/ml

Phosphatpuffer pH 2,5 mit 250 mM Kaliumsulfat und 40 mM Heptakis-(2,6-di-O-methyl)-β-Cyclodextrin
(vergrößerter Ausschnitt aus 5.16a)

Das auf diese Weise erhaltene Peakmuster muß noch genauer untersucht werden.

Um Cyclodextrin zu sparen, ist es ausreichend, den Cyclodextrin-Puffer nur noch zum Füllen der Kapillare und nicht mehr als Reservoirpuffer verwendet. Deswegen muß nur noch je höchstens 1 ml des betreffenden Puffers hergestellt werden, welcher dann in 300 µl-Mikroprobefläschchen abgefüllt wird (für die normalen Probfläschchen werden 3 ml benötigt). Dabei werden, bei deutlich reduziertem Cyclodextrin-Verbrauch, reproduzierbare Elektropherogramme erhalten, die denen aus den vorhergehenden Läufen (Cyclodextrinpuffer als Spül- und Laufpuffer) entsprechen (Abb. 5.14 – 5.16).

In diesem Fall muß zum einen die Ionenkonzentration des Puffers zur Verminderung der Adsorption an die Kapillarwand erhöht werden, zum anderen ist die Konzentration von 25 mM Cyclodextrin nicht ausreichend. Eine Erhöhung der Cyclodextrin-Konzentration führt unter diesen Bedingungen nicht zum Erfolg.

5.3 Trennung von Racematen verschiedener Aminosäuren

Es wird versucht, verschiedene Aminosäuren in ihre Enantiomere zu trennen. Dazu wird in Anlehnung an die in „Enantiomeric Separations in Capillary Zone Electrophoresis Using a Chiral Crown Ether“ [66] erwähnte Methode ein Puffer mit einem anderen, freundlicherweise zur Verfügung gestellten Kronenether (2,9,12,15,22-Pentaoxa-[2.7]-orthocyclo-[2]-(2,6)-pyranophan-28-on), dessen Eignung für diese Methode hier überprüft werden soll [67] eingesetzt:

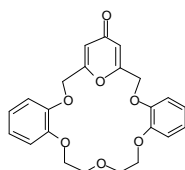
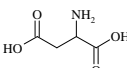
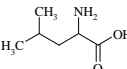
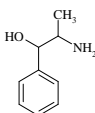
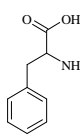
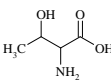
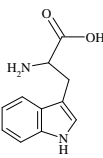


Abb. 5.17: 2,9,12,15,22-Pentaoxa-[2.7]-orthocyclo-[2]-(2,6)-pyranophan-28-on

5.3.1 Experimentelles

Verwendet werden die Aminosäuren Asparaginsäure (Asp), Leucin (Leu), Norephedrin (Nor), Phenylalanin (Phe), Threonin (Thr) und Tryptophan (Trp). In tabellarischer Form soll hier eine Kurzübersicht über einige Stoffeigenschaften gegeben werden:

Aminosäure (Fluka / Racemate)	Molekulargewicht [g/mol]	pK _s
Asparaginsäure (Asp) [617-45-8] 	133,10	1: 1,99 2: 9,90
Leucin (Leu) [328-39-2] 	131,17	1: 2,33 2: 9,74

Aminosäure (Fluka / Racemate)	Molekulargewicht [g/mol]	pK _s
Norephedrin (Nor) · HCl [154-41-6] 	187,67	9,4
Phenylalanin (Phe) [150-30-1] 	165,19	1: 2,58 2: 9,24
Threonin (Thr) [80-68-2] 	119,12	1: 2,16 2: 9,12
Tryptophan (Trp) [54-12-6] 	204,23	1: 2,38 2: 9,39

Tab. 5.3: Strukturformeln, M und pK_s der untersuchten Aminosäuren

In obigem Artikel führte ein Puffer folgender Zusammensetzung zum Erfolg [66]:

10 mM Tris- [Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-] Puffer (121,1 mg / 100 ml)
(bzw. 60,6 mg / 50 ml)

10 mM 18-Krone-6-tetracarbonsäure (440,4mg / 100 ml),

mit Zitronensäure auf einen pH von 2,5 eingestellt.

Die verwendeten Geräteeinstellungen waren:

Temperatur: Raumtemperatur

Injektion: 50 mBar, 0,1 min (6 s)

Spannung: 15 kV

Kapillare: 60/45 cm x 75 µm

Wellenlänge: 254 nm.

Hier wird die 18-Krone-6-tetracarbonsäure durch den oben erwähnten Kronenether ersetzt (410,4 mg / 100 ml bzw. 205,2 mg / 50 ml). Dieser Kronenether löst sich erwartungsgemäß nicht in dem wäßrigen Puffer. Deswegen werden verschiedene Zusätze ausprobiert: Methanol, Ethanol und THF sind ungeeignet. Aus einer Lösung von bis zu 35% DMSO fällt der Kronenether in einer Konzentration von 5 mM aus. Deswegen wird ein Puffer mit 40% DMSO verwendet, bei dem dann die Tris-Konzentration entsprechend niedrig ist (im Auslaßgefäß wird der Puffer ohne DMSO verwendet). Bei längerem Stehenlassen fällt jedoch auch aus der 40%igen DMSO-Lösung der Kronenether wieder aus. Deswegen wird 20 mM Tris-Puffer hergestellt, pH = 2,5, der mit 50 Vol.% DMSO versetzt wird. Der Kronenether wird zunächst in 5 ml DMSO gelöst und dann mit diesem Puffer auf 10 ml aufgefüllt. Auch dies führt nicht zum gewünschten Ergebnis, was den Schluß nahelegt, daß der hier verwendete Kronenether für Kapillarelektrophorese in polaren Medien nicht geeignet ist.

5.4 Diskussion


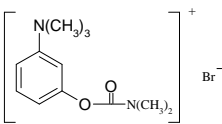

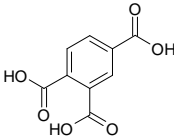
Die Enantiomerentrennung mittels Kapillarelektrophorese unter Zusatz chiraler Selektoren ist eine für viele Substanzen sehr einfach durchführbare Analysenmethode. In den meisten Fällen führt die Verwendung eines Standardpuffers, dem ein gängiges Cyclodextrin zugesetzt wird, zum Erfolg. Dies ist in Kap. 5.1 am Beispiel einiger Tramadol-Derivate dargestellt, und auch in der Literatur gibt es zahlreiche Beispiele dafür (vgl. [81-84]).

Dahingegen kann das in Kap. 5.2 eingesetzte Prolin-Derivat nicht in seine Enantiomeren aufgetrennt werden. Der in Kap. 5.3 verwendete Kronenether scheint ein sehr vielsprechender chiraler Selektor für derartige Trennungen zu sein, jedoch ist er im wäßrigen Medium unlöslich, und auch bei Verwendung einer Lösung mit 50 % DMSO ist er nicht in Lösung zu halten. Deswegen sollte für Kapillarelektrophorese im wäßrigen Medium mit Kronenethern als chiralen Selektoren stets eine leichter wasserlösliche Form wie z. B. die in [66, 82] benutzte Tetracarbonsäure verwendet werden.

6 Strategie zur Senkung der Detektionsgrenze in der Kapillarelektrophorese

6.1 Vorstellung der Modellsubstanzen

Wie in Kap. 1.2.5 theoretisch beschrieben, ist die Probenfokussierung eine einfache, aber äußerst wirksame Methode zur Senkung der Detektionsgrenze in der Kapillarelektrophorese. Hier soll die Leistungsfähigkeit dieser Methode am Beispiel einer bei üblicherweise verwendeten pH-Werten (vgl. [4]) anionischen Substanz, Trimellitsäure, sowie einer kationischen Substanz, Neostigminbromid, vorgestellt werden.

Analyt	M [g/mol]	pK _s	e _{max}
Neostigminbromid, Prostigmin [114-80-7]  	303,2	12	560 (Methanol, 261 nm)
Trimellitsäure, Benzol-1,2,4- tricarbonsäure (BTC) [528-44-9]  	210,14	pK _{s1} = 2,49 pK _{s2} = 3,96	11.700 (Methanol, 232 nm)

Tab. 6.1: Strukturformeln und einige Eigenschaften der untersuchten Analyten [68]

6.2 Probenfokussierung durch Feldverstärkung („Field amplified sample stacking“, FASS)

Für die Probenfokussierung durch Feldverstärkung gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten: Die Probenfokussierung mit hydrodynamischer (Field amplified sample stacking, FASS) sowie die Probenfokussierung mit elektrokinetischer Injektion (Field amplified sample injection, FASI) [24, 69, 70]. Diese sollen zunächst kurz erläutert werden.

6.2.1 Probenfokussierung mit hydrodynamischer Injektion (FASS)

Die Probenfokussierung mit hydrodynamischer Injektion ist eine einfache Möglichkeit der Probenaufkonzentrierung. Dazu muß die Probensubstanz in einer Lösung geringerer Leitfähigkeit als der Laufpuffer selbst gelöst werden, im einfachsten Fall in Wasser. Die Probe wird dann hydrodynamisch injiziert (s. Kap. 1.1.4.1), und an der Grenzfläche zwischen der Probelösung und der Pufferlösung kommt es beim Anlegen der Trennspannung zu einer Beschleunigung der Moleküle zur Grenzfläche hin und damit zu einer Aufkonzentrierung der Probe (s. Kap. 1.2.5). Durch Vorinjektion eines kurzen Pfropfens eines sehr hoch konzentrierten Puffers vor der Probeninjektion kann dieser Effekt noch verstärkt werden.

6.2.2 Probenfokussierung mit elektrokinetischer Injektion (FAEI)

Bei dieser Methode wird aus einem Einlaßgefäß mit einer Probelösung geringer Leitfähigkeit elektrokinetisch in die puffergefüllte Kapillare injiziert (s. Kap. 1.1.4.2) [71-73]. Die Probenfokussierung ist theoretisch proportional zum Feldverstärkungs-Faktor, d. h., ein großer Konzentrationsunterschied würde zu einer schmalen Probenzone und damit zu einer großen Aufkonzentrierung führen [74].

$$E_s = C_2/C_1 = E_1\mu_1/E_2\mu_2 \quad \text{Gl. 6.1}$$

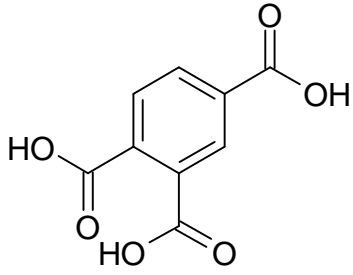
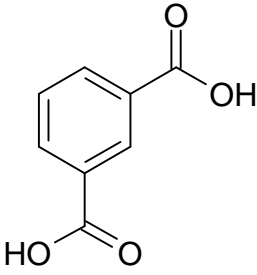
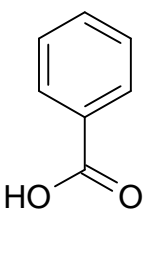
E_1 : Elektrische Feldstärke in der Probenzone

μ_1 : Elektrophoretische Mobilität des Analyten in der Probenzone

E_2 : Elektrische Feldstärke in der Pufferzone

μ_2 : Elektrophoretische Mobilität des Analyten in der Pufferzone

Von N. Gökhan [75] wurden die Detektionsgrenze (LOD) von Benzoesäure, Isophthal- und Trimellitsäure sowie der Einfluß ihrer Ladungs/Masse-Verhältnisse auf den EOF untersucht. Aufbauend darauf wurde die Methode für Trimellitsäure auf ein anderes Gerät sowie auf eine kationische Substanz übertragen.

		
Trimellitsäure [X]	Isophthalsäure [X]	Benzoesäure [X]
(Benzol-1,2,4-tricarbonsäure)	(Benzol-1,3-dicarbonsäure)	
[528-44-9]	[121-91-5]	[65-85-0]
M = 210,14 g/mol	M = 166,14 g/mol	M = 122,12 g/mol
pK _{S1} = 2,49 / pK _{S2} = 3,96	pK _S = 3,7	pK _S = 4,2

Tab. 6.2: Strukturformeln und einige Eigenschaften der untersuchten Analyten [68]

6.3 Ergebnisse mit dem Meßgerät Crystal CE 310 der Firma Unicam (s. Kap.10)

6.3.1 Hydrodynamische Probeninjektion (FASS)

Zuerst werden die optimalen Injektionsbedingungen für eine Probenaufkonzentrierung mit hydrodynamischer Injektion ermittelt. Dabei wird zunächst eine Lösung von 1.000 µg/ml Trimellitsäure in Wasser verwendet, als Puffer ein Boratpuffer 100 mM, pH = 9,2 (s. Kap. 10.3.4).

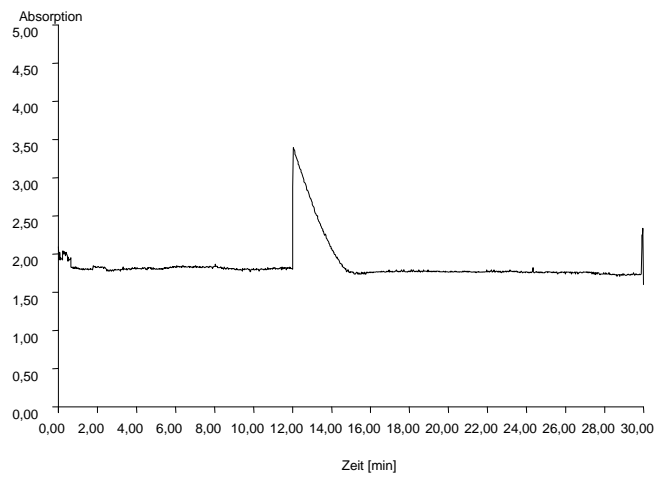


Abb. 6.1: $t_{\text{Inj, Probe}} = 0,5 \text{ min}$ (25 mBar) / $U_{\text{Trenn}} = 30 \text{ kV}$

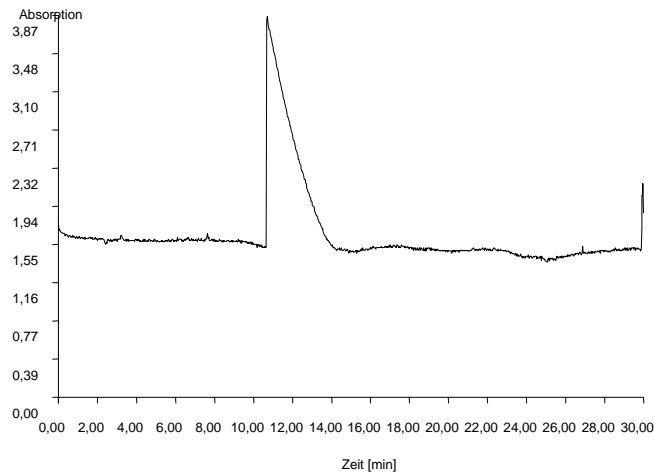


Abb. 6.2: $t_{\text{Inj, Probe}} = 1 \text{ min}$ (25 mBar) / $U_{\text{Trenn}} = 30 \text{ kV}$

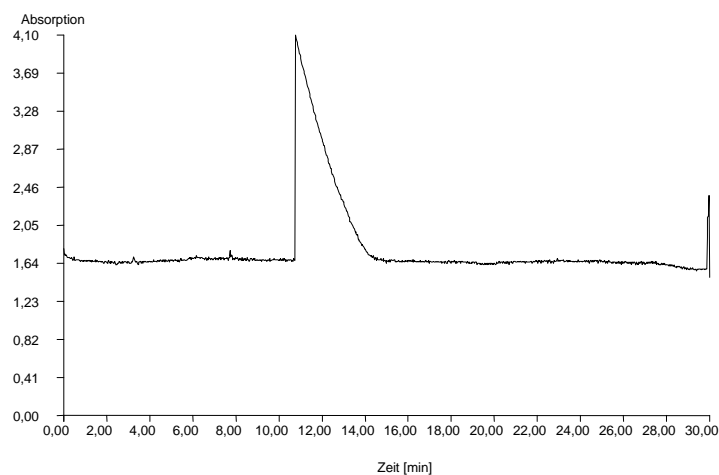


Abb. 6.3: $t_{\text{Inj, Probe}} = 0,5 \text{ min (50 mBar)}$ / $U_{\text{Trenn}} = 30\text{kV}$

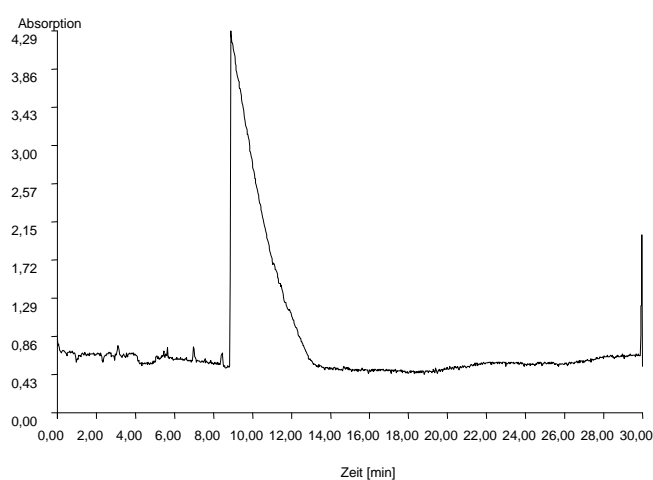


Abb. 6.4: $t_{\text{Inj, Probe}} = 1 \text{ min (50 mBar)}$ / $U_{\text{Trenn}} = 30\text{kV}$

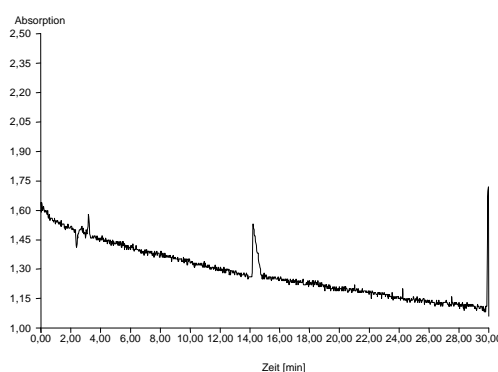


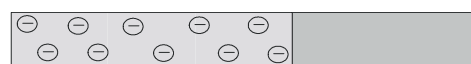
Abb. 6.5: Trimellitsäure, $c = 1 \mu\text{g/ml}$, Bedingungen wie oben

Wie aus Abb. 6.1-6.4 hervorgeht, ist eine Injektion über 1 min bei 50 mBar am besten zur Aufkonzentrierung von Trimellitsäure geeignet. Die Trennungsspannung beträgt 30 kV, als Wellenlänge wird 210 nm gewählt. In Abb. 6.5 ist erkennbar, daß man an die Grenze der Methode der Probenfokussierung mit hydrodynamischer Injektion stößt. Hier beträgt die Konzentration an Trimellitsäure $1 \mu\text{g/ml}$ bei 210 nm (im Vergleich zu $1.000 \mu\text{g/ml}$ in Abb. 6.1 –

6.4) und einem Signal/Rausch-Verhältnis von $S/N = 12$. Deshalb wird im folgenden die elektrokinetische Injektion (FASI) eingesetzt.

6.3.2 Elektrokinetische Injektion (FASI)

Unter Beibehaltung der restlichen oben angeführten Parameter wurde elektrokinetisch injiziert. Die elektrokinetische Injektion beruht darauf, daß, hervorgerufen durch elektrophoretische und elektroosmotische Bewegung, Probe aufgrund elektrophoretischer Migration in die Kapillare wandert. Dadurch, daß Anionen bei Verwendung normaler Polung (Einlaß: Anode), bedingt durch die am Kapillareinlaß auftretende hohe Feldstärke, abgestoßen werden, konnte trotz verschiedener Trenn- und Injektionsspannungen sowie Injektionszeiten kein Peak beobachtet werden. Bei umgekehrter Polung müßten die Anionen zwar in die Kapillare hineinwandern, würden aber durch den umgekehrten EOF sofort nach Erreichen der Grenzfläche Proben-/Pufferzone wieder herausgedrückt werden. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, ist, vor der Probeninjektion einen kurzen Pfropfen niedriger Leitfähigkeit (z. B. Wasser oder Probelösung) hydrodynamisch zu injizieren. Dadurch ergibt sich ein „leerer“ Bereich zur Probeninjektion, so daß die Probenmoleküle in diesem Fall nicht durch den EOF der puffergefüllten Kapillare herausgedrückt werden (Abb. 6.6).



Nach der hydrodynamischen Injektion



Nach der elektrokinetischen Injektion

Abb. 6.6: Aufkonzentrierung einer anionischen Substanz

Durch den Wasserpfropfen erhält man außerdem wegen der größeren Aufkonzentrierung (s. Kap. 1.1.5) ein höheres Detektorsignal, was zu einer höheren Empfindlichkeit führt, wenn die Probe in Wasser gelöst wurde, weil dadurch eine hohe Feldstärke an der Injektionsstelle erreicht wird. Eine Erhöhung der Pufferkonzentration von 60 auf 100 mM führt zwar theoretisch zu einer Verbesserung der Aufkonzentrierung, aber infolge einer EOF-Abnahme¹ kommt es auch zu längeren Migrationszeiten. Wie erwartet, wird auf die oben beschriebene Weise eine höhere Trennstufenzahl erreicht. Infolge der stärkeren Fokussierung kann hier auch mehr Probe injiziert werden (die Kapillare wurde zu drei Viertel mit der Probelösung gefüllt, dann wurde noch elektrokinetisch Probe injiziert). Für Trimellitsäure, Isophthalsäure und Benzoesäure können

¹ Die Schichtdicke der diffusen Doppelschicht und damit auch der EOF nimmt mit der Wurzel der Ionenstärke der Elektrolytlösung ab [9]

Konzentrationen von jeweils 10^{-3} $\mu\text{g/ml}$ ($S/N = 8$), 10^{-2} $\mu\text{g/ml}$ ($S/N = 10$) sowie für Benzoesäure ebenfalls 10^{-2} $\mu\text{g/ml}$ ($S/N = 10$) noch sicher detektiert werden.

Untersucht wurde der Einfluß der Länge des Wasserpfropfens und der Erhöhung der Injektionszeit. Durch die Länge des Wasserpfropfens wurde die Empfindlichkeit stark beeinflusst. Wenn der Wasserpfropfen zu lang ist, nimmt die Empfindlichkeit erwartungsgemäß ab. Beim Vergleich von Elektropherogrammen mit 1 bzw. 6 min Wasserpfropfen-Injektion (jeweils bei 5 min Probeninjektion) kann eine Steigerung der Empfindlichkeit um zwei Größenordnungen beobachtet werden (Abb. 6.7 und 6.8).

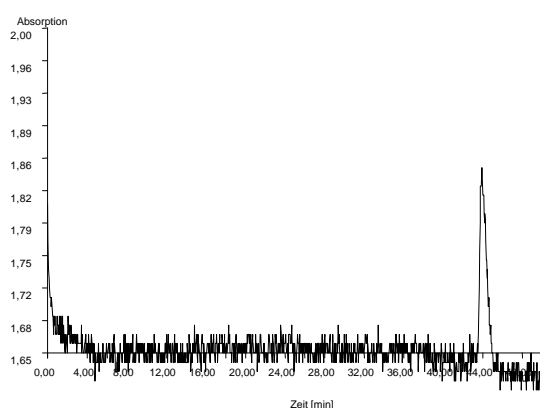


Abb. 6.7: 10^{-1} $\mu\text{g/ml}$ Trimellitsäure, 1 min Wasser

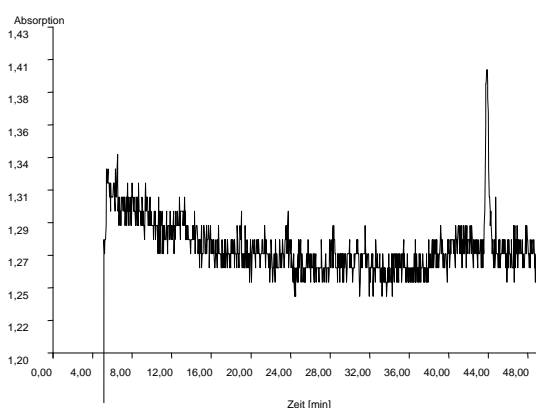


Abb. 6.8: 10^{-3} $\mu\text{g/ml}$ Trimellitsäure, 6 min Wasser

Gleichzeitig wird durch Injektion eines längeren Wasserpfropfens eine kürzere Laufzeit bewirkt. Um den Empfindlichkeitsverlust aufgrund des langen Wasserpfropfens zu vermeiden und trotzdem eine kurze Laufzeit zu erzielen, kann der Wasserpfropfen auch bei höherem Druck injiziert werden. Dabei muß beachtet werden, daß die Länge des Wasserpfropfens ausreichend sein muß um zu gewährleisten, daß ein Teil nach der Injektion in der Kapillare verbleibt, da er während der Injektion der Anionen aus der Kapillare „herausgedrückt“ wird und nach ihm auch die Anionen herauswandern würden. Hier kann eine höhere Empfindlichkeit durch eine höhere Injektionszeit erreicht werden. Ab einer bestimmten Injektionsspannung nimmt die injizierte Menge weniger als linear mit derselben zu, da in der Zone hoher Feldstärke Probenverarmung auftritt. Auch sollten die Probengefäße, vor allem bei Verwendung von Mikrogefäßen, nur einmal verwendet werden. Bei FASI wird die Probelösung durch Elektroosmose in die Kapillare gezogen [Kap. 1.1.5]. Wegen der durch die hohe Spannung verursachten hohen Temperatur kann es zum Kochen der Flüssigkeit und zur Zersetzung der Probe kommen; auch kann die Polyimidschicht angegriffen und sogar die eigentliche Kapillare aufgeweicht werden. Theoretisch müßte wegen des Ladungs/Masse-Verhältnisses von Trimellitsäure ihre elektrophoretische Mobilität größer sein als die der Benzoesäure (s. Tab. 6.2) und folglich sollte die Reihenfolge der Migrationszeiten Benzoesäure – Isophthalsäure – Trimellitsäure sein

(letztere sollte die höchste dem EOF entgegengerichtete Mobilität besitzen). In diesem Falle kann aber angenommen werden, daß die Trimellitsäure wegen ihrer höheren Ladungsdichte viel mehr hydratisiert ist als die Benzoessäure. Dadurch wird ein wesentlich höherer effektiver Radius erhalten, so daß das effektive Ladungs/Masse-Verhältnis kleiner wird als das der Benzoessäure und die zur Anode gerichtete elektrophoretische Mobilität abnimmt, so daß die Trimellitsäure letztendlich eine kleinere Migrationszeit besitzt als die Benzoessäure.

6.4 Übertragung der Methode auf ein anderes Meßgerät (SpectraPhoresis 1000, s. Kap. 10)

Der prinzipielle Unterschied zwischen den beiden Meßgeräten besteht darin, daß das Unicam-Gerät im Gegensatz zum kompakten TSP-Gerät modular aufgebaut ist sowie eine wesentlich flexiblere Programmierung des Meßgerätes erlaubt. Außerdem beträgt die Standard-Kapillarlänge beim TSP-Gerät 42,5 cm im Vergleich zu mindestens 60 cm beim Unicam Gerät. Deshalb wurde die Trennungsspannung beim TSP-Gerät auf 20 kV herabgesetzt, was einer Feldstärke von 471 V/cm (Unicam-Gerät: 500 V/cm) entspricht. Sieht man sich die unter 6.3.1 verwendete Methode (s. Kap. 10) an, so stellt man fest, daß innerhalb eines Probenlaufs eine Lösung niedriger Leitfähigkeit bzw. Probelösung hydrodynamisch injiziert wird als auch mehrere Minuten elektrokinetisch Probe injiziert wird. Beim TSP-Gerät kann jedoch nur einfach injiziert werden. Eine Möglichkeit, dieses vom Programm gegebene Hindernis zu umgehen ist, die hydrodynamische Injektion durch einen Spülschritt zu ersetzen. Leider kann nicht über den erforderlichen Zeitraum elektrokinetisch injiziert werden, da dieser auf 100 s begrenzt ist. Außerdem ist es nicht möglich, in einer Methode eine positive Laufspannung (Auslaß: Kathode) und gleichzeitig eine negative Injektionsspannung zu programmieren. Die Notwendigkeit dazu wurde bereits unter Punkt 6.3.2 dargelegt. Zunächst sollen zwei Elektropherogramme gezeigt werden, die mit Probenaufkonzentrierung mit hydrodynamischer Injektion entstanden sind.

6.4.1 Hydrodynamische Probeninjektion (FASS)

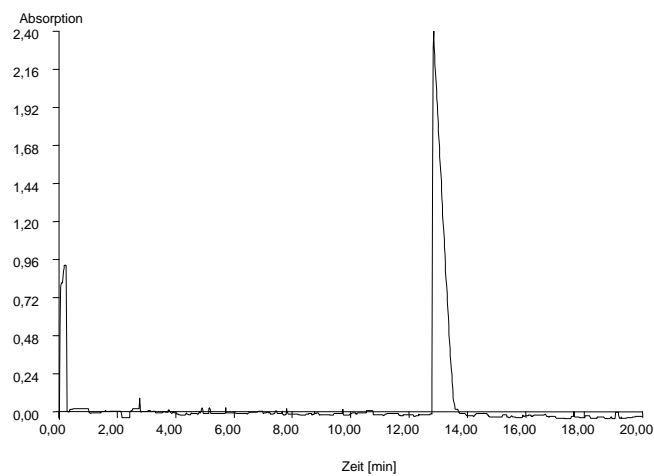


Abb. 6.9: TMS 100 $\mu\text{g/ml}$, Inj. 10 s, $U = 20 \text{ kV}$

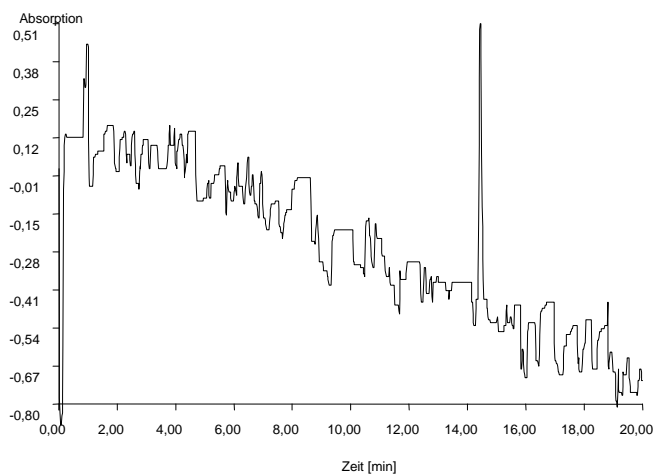


Abb. 6.10: TMS 100 $\mu\text{g/ml}$, Inj. 1 s, $U = 20 \text{ kV}$

Wie man dem Elektropherogramm Abb. 6.10 entnehmen kann, ist man bei den gewählten Bedingungen schon in der Nähe der Detektionsgrenze.

6.4.2 Elektrokinetische Probeninjektion (FAEI)

Angesichts der unter 6.4 beschriebenen Schwierigkeiten, eine Probenaufkonzentrierung am Kapillareinlaß mit dem TSP-Gerät durchzuführen, muß überlegt werden, wie dieses Problem zu umgehen ist. Wie bereits weiter oben angesprochen, wird der hydrodynamische Injektionsschritt durch einen Spülvorgang ersetzt. Jetzt muß aber noch eine Möglichkeit gefunden werden, wie die elektrokinetische Injektion mit umgekehrter Polung erfolgen kann. Der einzige Weg, um dies mit dem Programmpaket „PC 1000 3.0.3“ durchzuführen, besteht darin, die elektrokinetische Injektion durch einen eigenen Lauf zu simulieren. Wird die oben beschriebene Methode direkt übertragen, erhält man keine auswertbaren Elektropherogramme. Dies liegt an der prinzipiellen Verschiedenheit der beiden Meßgeräte. Zunächst wird ermittelt, wie lange es dauert, bis die Probelösung unter Spüldruck durch die mit Puffer gefüllte Kapillare gespült wird. Da dieser Vorgang ungefähr 5 Minuten in Anspruch nimmt, wird für die hydrodynamische „Injektion“ eine Zeit von 3 bis 4 Minuten gewählt (beim Unicam-Gerät wurde bis zu 16 Minuten bei 50 mBar injiziert). Damit die Stromstärke während der elektrokinetischen Injektion (die ja mit dem TSP-Gerät als Lauf programmiert werden muß) beobachtet werden kann, muß eine Spannung von mindestens -4 kV gewählt werden, da die Stromstärke ansonsten zu niedrig ist, um vom Meßgerät angezeigt zu werden. Ein Elektropherogramm, das auf obigen Überlegungen basiert, soll hier gezeigt werden:

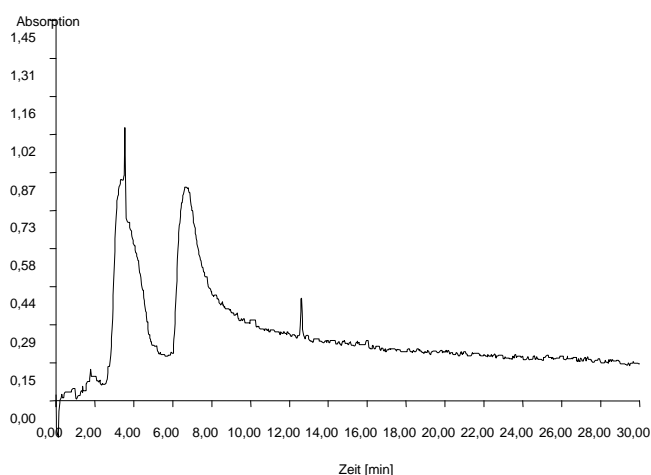


Abb. 6.11: TMS $10\text{ }\mu\text{g/ml}$, Inj_h : 3 min, Inj_e : 7,5 min / -4 kV , $U_{\text{Trenn}} = 20\text{ kV}$
 Inj_h : hydrodynamische Injektion Inj_e : elektrokinetische Injektion

Betrachtet man die Stromstärke während des „Injektionslaufs“, so stellt man fest, daß die Stromstärke nach ca. 3,3 Minuten stark ansteigt (schematisch in Abb. 6.12 dargestellt).

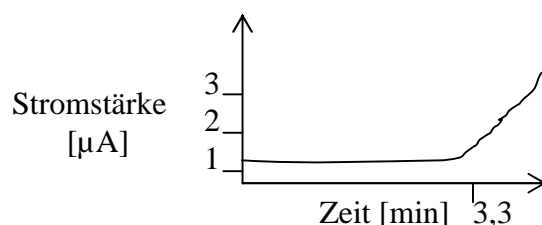


Abb. 6.12: Verlauf der Stromstärke während der elektrokinetischen Injektion von Trimellitsäure (vgl. Abb. 6.11)

Das läßt darauf schließen, daß der weiter oben beschriebene Fall eingetreten ist: Die Probe wird teilweise wieder aus der Kapillare herausgedrückt. Zu diesem Zeitpunkt ist die ganze Kapillare mit Puffer gefüllt, die Stromstärke steigt deswegen an, und man erhält nicht reproduzierbare Elektropherogramme (wie in Abb. 6.11). Um nun zum gewünschten Erfolg zu kommen, wurde die Zeit für die elektrokinetische Injektion auf 3,2 Minuten reduziert (Abb. 6.13).

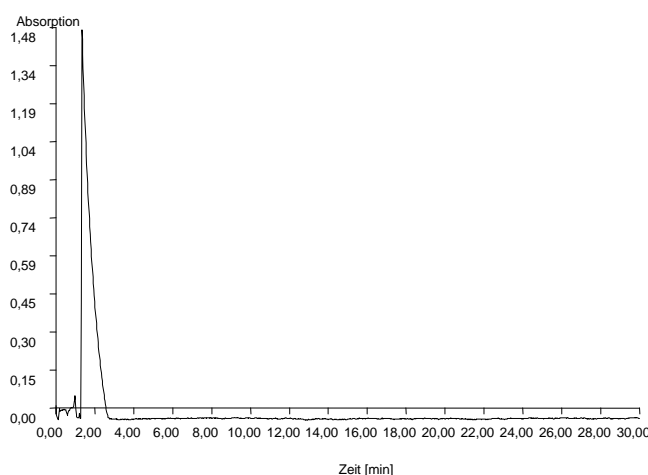


Abb. 6.13: TMS 10 µg/ml, Inj_h: 3 min, Inj_e: 3,2 min / -4 kV, $U_{\text{Trenn}} = 20 \text{ kV}$

Da diese Methode erfolgversprechend schien, wurden jeweils Messungen mit niedrigeren Konzentrationen von Trimellitsäure und entsprechend angepaßten Injektionszeiten durchgeführt (Abb. 6.14 – 6.17). So konnte die Substanz noch bis zu einer Konzentration von 10^{-4} µg/ml zweifelsfrei detektiert werden (Abb. 6.17).

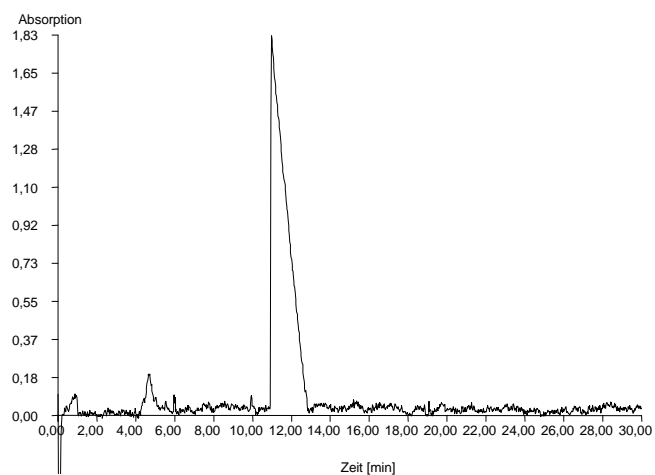


Abb. 6.14: TMS 1 $\mu\text{g/ml}$, Inj_h: 3 min, Inj_e: 3 min / -4 kV, $U_{\text{Trenn}} = 20 \text{ kV}$

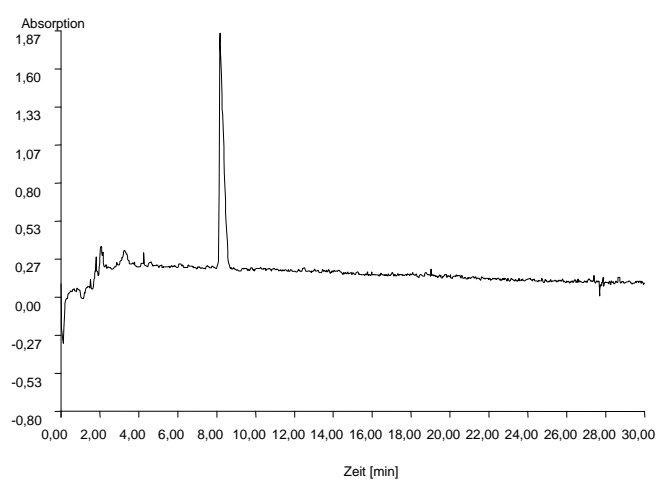


Abb. 6.15: TMS 0,1 $\mu\text{g/ml}$, Inj_h: 3 min, Inj_e: 3 min / -4 kV, $U_{\text{Trenn}} = 20 \text{ kV}$

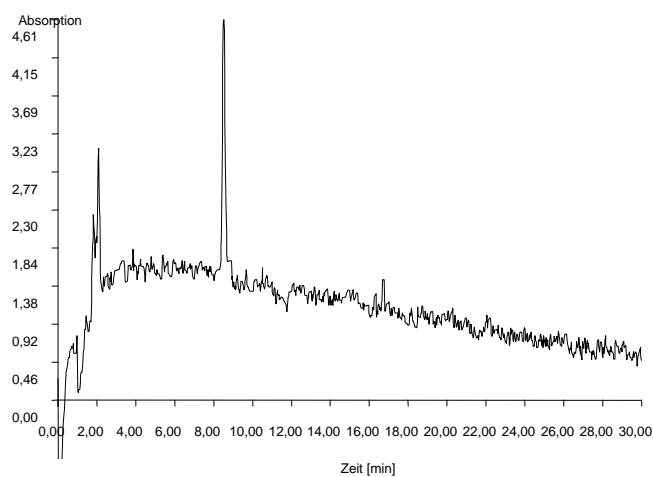


Abb. 6.16: TMS $10^{-2} \mu\text{g/ml}$, Inj_h: 3 min, Inj_e: 3 min / -4 kV, $U_{\text{Trenn}} = 20 \text{ kV}$

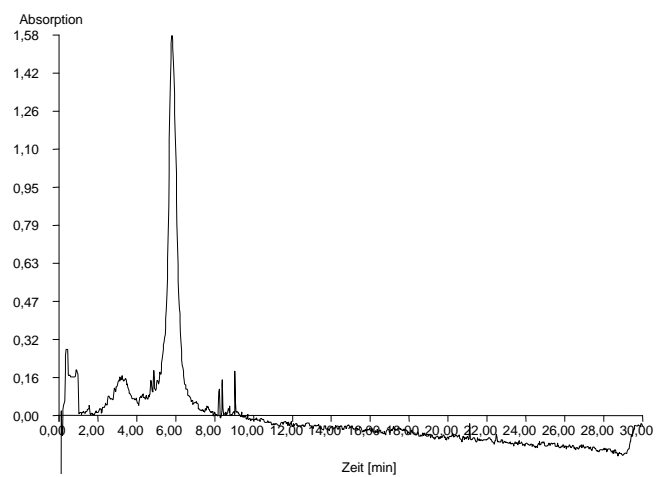


Abb. 6.17: TMS 10^{-3} $\mu\text{g/ml}$, Inj_h : 4 min, Inj_e : 4,5 min / -4 kV, $U_{\text{Trenn}} = 20$ kV

6.5 Entwicklung einer Methode für Neostigminbromid

Für eine Substanz, deren Mobilität das gleiche Vorzeichen wie die des EOF besitzt, gelten natürlich völlig andere Voraussetzungen. Bei einer Substanz, deren Mobilität das entgegengesetzte Vorzeichen derer des EOF besitzt kann, wie weiter oben dargestellt, gerade durch das Ausnutzen dieses Sachverhaltes eine erfolgreiche Aufkonzentrierung erreicht werden: Zuerst wird die Kapillare hydrodynamisch zu ungefähr drei Viertel mit der sehr verdünnten Probelösung gefüllt. Während dieser Probepfropfen bei Anlegen der Injektionsspannung wieder in Richtung des Kapillareinlasses zurückgedrückt wird, werden gleichzeitig mehr Probemoleküle elektro-kinetisch injiziert und an der Grenzfläche zur vom Kapillarauslaß dagegengedrückten Pufferlösung aufkonzentriert. In dem hier behandelten Fall muß also eine völlig andere Methode angewandt werden. Dabei ist es sehr wichtig zu beachten, daß jetzt EOF und Probe in die gleiche Richtung wandern. In diesem Fall kann die Kapillare nicht zu drei Viertel mit der Probelösung gefüllt werden, da jetzt ja mit der gleichen Polung wie später beim eigentlichen Lauf injiziert werden muß, so daß der Probepfropfen während der elektrokinetischen Injektion zur Detektorseite herausgedrückt werden würde. Hier muß also zunächst ein kurzer Pfropfen Probelösung hydrodynamisch injiziert werden; auf diesen wird wiederum Probe elektrokinetisch injiziert (Abb. 6.18).



Nach der hydrodynamischen Injektion



Nach der elektrokinetischen Injektion

Abb. 6.18: Aufkonzentrierung einer kationischen Substanz

6.6 Diskussion

Durch Probenaufkonzentrierung mit elektrokinetischer Injektion (FAEI) konnte eine 100fache Verbesserung der Empfindlichkeit gegenüber Probenaufkonzentrierung mit hydrodynamischer Injektion erreicht werden. Der große Vorteil dieser Art der Probenaufkonzentrierung in der Kapillarelektrophorese ist die Einfachheit der Handhabung: Die Probe wird in einem niedrig konzentrierten Hintergrundelektrolyt gelöst und injiziert, was diese Methode der Probenanreicherung in jedem Elektrolytsystem universell anwendbar macht. Wie in Kap. 6.3.2 und 6.4.2 gezeigt, wird durch feldverstärkte Probenfokussierung mit elektrokinetischer Injektion die größte Empfindlichkeitsverbesserung bewirkt. Für das Probenvolumen gibt es praktisch keine Begrenzung, eine Verbesserung der Empfindlichkeit um drei Größenordnungen gegenüber einer Methode ohne Probenaufkonzentrierung kann normalerweise erreicht werden. Bei all diesen Vorteilen, die aufgezeigt wurden, muß auf die recht aufwendige Methodenentwicklung hingewiesen werden, auch in bezug auf die Programmierung (s. Kap. 6.4). Zunächst ist es wichtig, einen stabilen EOF zu erhalten, damit man konstante Migrationszeiten erhält. Dazu muß die Kapillare sorgfältig konditioniert und äquilibriert werden (Kap. 10). Dies ist Voraussetzung für die Optimierung der Länge eines Pfropfens niedriger Leitfähigkeit (z. B. Wasser, Kap. 6.3.2). Die elektrische Feldstärke, die Leitfähigkeit des Probelösungsmittels und der Lösungsmittel der angrenzenden Zonen sowie der pH-Wert werden in diesem Schritt ebenso angepaßt. So können unter Verwendung eines UV/Vis-Detektors im Falle von Trimellitsäure Konzentrationen von 0,1 nmol/l erfaßt werden, was den mit LIF-Detektion erfaßbaren Konzentrationen vergleichbar ist. Im Vergleich mit anderen Fokussierungsmethoden führt die Methode der Probenaufkonzentrierung mit elektrokinetischer Injektion (FAEI) zum größten Gewinn an Empfindlichkeit. Darüberhinaus kann sie mit normal ausgestatteten Kapillarelektrophorese-Geräten durchgeführt werden. Bei Geräten mit einem besseren Detektor (s. z. B. LIF weiter oben) würden sich beide Effekte addieren, so daß noch niedrigere Konzentrationen nachweisbar wären.

7 Fehlersuche in der CE

Wie in den vorhergehenden Kapiteln beschrieben, ist die Kapillarelektrophorese eine sehr leistungsfähige, moderne Trenntechnik. Leider gibt es hier, wie bei jeder anderen Trenntechnik auch, Fehlerquellen [1,3,21,76]. Auf diese soll hier näher eingegangen werden, wobei, wenn nicht anders vermerkt, von der Verwendung von UV-Detektoren ausgegangen wird.

7.1 Strom- bzw. Spannungsprobleme

Da die Kapillarelektrophorese eine Trenntechnik ist, welche hauptsächlich auf der unterschiedlichen Mobilität verschiedener Ionen beruht (vgl. Kap. 1), ist eine der wichtigsten Fehlerquellen die Stromversorgung. Zunächst muß überprüft werden, ob die in der Analysenmethode vorgegebenen Parameter für Spannung, Stromstärke oder elektrische Feldstärke richtig eingestellt sind.

Für einen Stromzusammenbruch können z. B. Luftblasen die Ursache sein. Zur Behebung des Problems kann die Kapillare neu befüllt werden, wodurch in ihr vorhandene Luftblasen herausgedrückt werden. Dies kann natürlich nur dann funktionieren, wenn der Probenlift richtig arbeitet, d. h., die Elektroden müssen in die mit der passenden Lösung ausreichend befüllten Probengefäße eintauchen, und diese müssen zum Anlegen eines Druckunterschiedes ausreichend dicht sein. Das Entgasen der Lösungen und eine Reduktion der Trennungsspannung sind weitere mögliche Schritte zur Behebung des Problems.

Sollte das Problem weiterhin auftreten, ist entweder von einer verstopften Kapillare auszugehen, oder das Injektionssystem funktioniert nicht richtig. Zunächst kann versucht werden, die Kapillarenden nachzuschneiden und die Kapillare mit einem geeigneten Reagenz zu spülen. In vielen Fällen, insbesondere, wenn die Kapillare gebrochen ist, muß die Kapillare durch eine neue ersetzt werden. Die richtige Funktion des Injektionssystems kann dann durch Austausch der Kapillare und Durchspülen mit einer Lösung, die ein Detektorsignal erzeugt, überprüft werden.

Ein weiteres Problem kann darin bestehen, daß eine zu lange Zone an Probe niedriger elektrischer Leitfähigkeit injiziert wird. Dies kann durch ein Herabsetzen der Injektionszeit, höhere Probenkonzentration oder elektrokinetische Injektion vermieden werden.

Bei durch Kriechströmen verursachten Stromzusammenbrüchen muß das Gerät gereinigt werden. Kriechströme können sich dadurch bemerkbar machen, daß z. B. ein Strom angezeigt wird, ohne daß Spannung anliegt.

Kann aufgrund hoher Luftfeuchtigkeit von Kondenswasserbildung ausgegangen werden, ist für den Kapillarofen eine Temperatur von mindestens 5°C über Raumtemperatur zu wählen.

Im Zweifelsfall kann die Verwendung einer anderen Kapillarcharge in Erwägung gezogen werden.

7.2 Fehlen von Peaks

Zunächst muß, wie unter 7.1 erwähnt, die korrekte Einstellung sämtlicher Parameter wie Spannung, Wellenlänge, Temperatur und natürlich der Injektionsparameter überprüft werden.

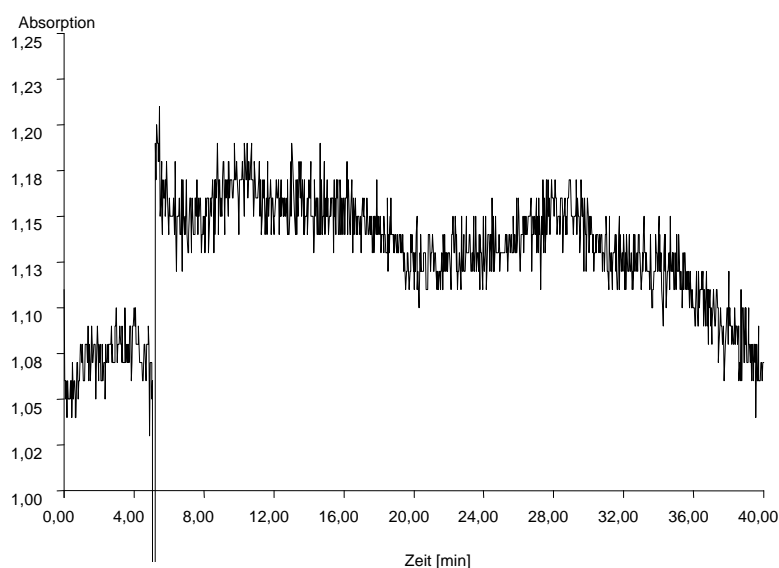


Abb. 7.1: Keine Probe injiziert

Auch muß die richtige Position von Puffer- und Probengefäßen kontrolliert werden. In vielen Fällen muß der Analyt in einer niedrigeren Konzentration bzw. in einem anderen Lösungsmittel oder durch Zusatz eines Lösungsvermittlers in Lösung gebracht werden.

Oft wird, vor allem bei der Übertragung einer Methode auf ein anderes Gerät, eine zu kurze Laufzeit gewählt, so daß die Substanz erst während des Spülvorganges nach dem eigentlichen Lauf durch das Detektionsfenster wandert. Dies kann durch Durchspülen des Analyten unter Beobachtung der Absorption überprüft werden. Das Detektionsfenster muß ausgerichtet und frei von störenden Partikeln sein, um ein Durchtreten des Detektorstrahles zu gewährleisten. Bei den meisten Detektoren kann man die Intensität des Vergleichs- und des Meßstrahles messen und so auf die Güte des Detektorfensters schließen. Bei einem sehr schlechten Verhältnis (sehr niedrige Intensität des Meßstrahles) muß das Detektionsfenster neu ausgerichtet und evtl. nachgebrannt und gereinigt werden. Ist schon die Intensität des Vergleichsstrahles sehr niedrig, muß die Detektorlampe erneuert werden. Sind alle diese Punkte überprüft und die Fehler behoben, aber

immer noch keine Peaks sichtbar, kann noch überprüft werden, ob die Datenaufnahme richtig programmiert wurde. In diesem Punkt können vor allem bei modular aufgebauten Meßgeräten Fehler auftreten, da bei diesen die Parameter zur Steuerung des Meßgerätes und für die Datenaufnahme oft in unterschiedlichen Programmen eingegeben werden.

7.3 Auftreten von unerwarteten Peaks

Treten neben den eigentlich erwarteten noch weitere Peaks auf, ist zunächst von einer Verunreinigung der Probe bzw. des Lösungsmittels oder von einer Zersetzung der Probe auszugehen. Die Verwendung eines Mehrkomponenten-Puffers kann genauso wie das Lösen des Analyten in einem anderen Lösungsmittel als dem Laufpuffer und Verwendung eines anderen pH-Wertes in den betreffenden Lösungen zu Systempeaks führen. Daher bietet es sich an, möglichst einfache Puffersysteme zu verwenden und den Proben- und Puffer-pH anzugleichen sowie die Probe im Laufpuffer zu lösen. Dies gilt vor allem bei der indirekten Detektion [27].

Genauso wie bei der HPLC [76] können auch bei der CE konzentrationsabhängige Doppelpeaks auftreten. Als Gegenmaßnahmen sind hier eine Erhöhung der Pufferkonzentration, die Verwendung eines anderen Puffersystems oder ein Herabsetzen der Injektionszeit bzw. der Probenkonzentration möglich.

Das Auftreten von „Geisterpeaks“ kann durch Adsorption des Analyten bzw. von Begleitstoffen an die Kapillarwand als auch durch Luftblasen in Puffer oder Probe hervorgerufen werden.

Adsorption an die Kapillarwand kann durch Zusatz entsprechender Salze, Wahl eines anderen pH-Wertes oder geeignete Spülsbstanzen verhindert werden. Zum Entfernen von Luftblasen aus Probe oder Puffer werden diese entweder im Ultraschallbad entgast oder filtriert.

7.4 Schlechte Peakform

Wurden alle Punkte unter 7.1 bis 7.3 beachtet, was eine Überprüfung von Spannung, Temperatur und Puffer, Injektionszeit und Probenkonzentration beinhaltet, sollten gute Elektropherogramme erhalten werden. Ein Faktor, der zu schlechten Peakformen führen kann, ist das falsche Zuschneiden der Kapillaren. Verwendet man keine Fertigkapillaren, so ist darauf zu achten, mit einem geeigneten Kapillarschneider die Kapillarenden gerade zuzuschneiden und sie mit einer Lupe auf Unebenheiten zu überprüfen.

Vor allem bei der Verwendung von Proteinen kommt es zur Adsorption an die Kapillarwand. Diese Effekte können durch die Wahl des richtigen pH-Werts, entsprechender Pufferzusätze und Spülreagenzien minimiert werden. Darüberhinaus kann die Verwendung einer geeigneten beschichteten Kapillare in Betracht gezogen werden.

Genauso wie bei der HPLC führt auch bei der CE eine Überladung der Kapillare zu schlechten Peakformen. Dies kann durch Verdünnen der Probelösung bzw. Reduzieren der Injektionszeit vermieden werden.

7.5 Schlecht reproduzierbare Migrationszeiten

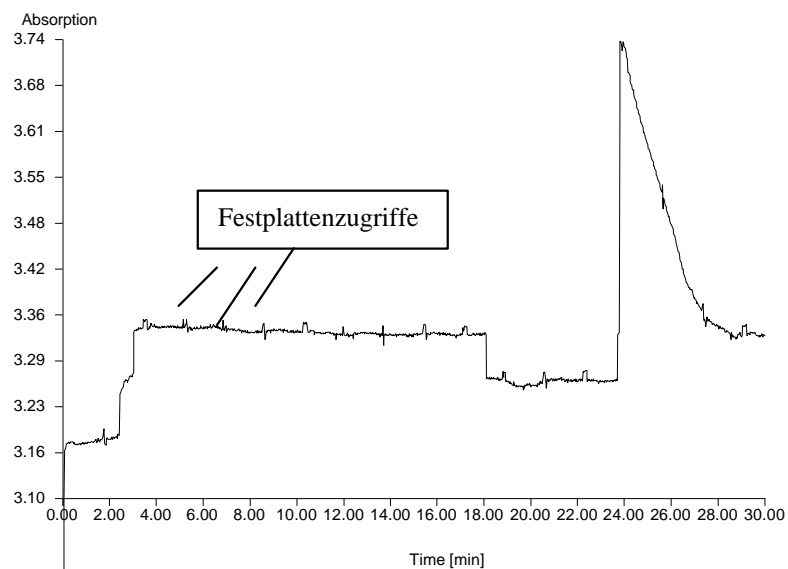
Um einen gleichbleibenden EOF und damit reproduzierbare Migrationszeiten zu erhalten, muß der pH-Wert im richtigen Bereich liegen und ein Puffer verwendet werden, der für diesen pH-Bereich geeignet ist und der eine ausreichende Kapazität besitzt. Die Kapillare muß außerdem richtig konditioniert, äquilibriert und thermostatisiert sein. Die Äquilibration wird vor allem im leicht sauren pH-Bereich, in dem der EOF sehr instabil ist, besonders wichtig [77]. Enthält der Puffer leicht verdunstende Substanzen, muß die Verdunstung von Pufferbestandteilen durch geeignete Maßnahmen (Deckel, Übersichtung) verhindert werden [77,78].

7.6 Schlecht reproduzierbare Peakflächen

Vor allem bei elektrokinetischer Injektion tritt Probenverarmung auf, die zu abnehmenden Peakflächen führt. Abhilfe schafft hier die Verwendung eines neuen Probengefäßes für eine Injektion.

7.7 Sonstiges

Treten Probleme auf, für die keine der oben erwähnten Ursachen verantwortlich gemacht werden können, gibt es noch weitere Fehlerquellen, die meist mit der eigentlichen Kapillarelektrophorese wenig zu tun haben. So kann eine Drift in elektronischen Schaltkreisen vorliegen, was sich auch in der Basislinie der Elektropherogramme entsprechend auswirken kann. Durch nahe Wechselstromleitungen induzierte Ströme in Schaltkreisen können sich genauso bemerkbar machen wie Störungen, welche durch den Meßrechner selbst hervorgerufen werden können:



Basislinienschwankungen durch Festplattenzugriffe

Auch kann es zu Unregelmäßigkeiten infolge von Lecks im Vakuumsystem kommen, was zu nicht reproduzierbaren Peakflächen oder gar zum Abbruch einer Meßserie führen kann. Temperatureinflüsse auf Detektoren können sich u. a. durch eine schwankende Basislinie bemerkbar machen. Da in der CE zumeist UV-Detektoren verwendet werden, ist weiterhin zu beachten, daß sich die UV-Durchlässigkeit von Glasfaserkabeln mit der Zeit verschlechtert.

Im folgenden Kapitel 7.8 (Tab. 7.1) sind alle bekannten Fehlerquellen mit Vorschlägen zu ihrer Behebung tabellarisch dargestellt.

7.8 Tabellarische Zusammenfassung

Sichtbare Auswirkung	Problem	Lösungsmöglichkeit
1. Strom- bzw. Spannungsprobleme	Richtiger Puffer und Puffergefäße	überprüfen
	Parameter falsch eingestellt	überprüfen
	Luftblasen	Kapillare neu befüllen
		Probenlift überprüfen
		Flüssigkeitszustand in den Gefäßen überprüfen
		Dichtigkeit der Gefäße überprüfen
		geeignete Gefäße verwenden
		Entgasen der Lösungen
		Reduktion der Trennspannung
	Kapillare verstopft	durchspülen
		Kapillarenden nachschneiden
		ersetzen
	Injektionssystem defekt	Reparatur
	Probenzone zu lang	Herabsetzen der Injektionszeit
		höhere Probenkonzentration
		elektrokinetische Injektion
	Kriechströme	Reinigen des Gerätes
	hohe Luftfeuchtigkeit	höhere Temperatur wählen
	unbekannte Ursache	andere Kapillarcharge verwenden
2. Fehlen von Peaks	Parameter falsch eingestellt (Wellenlänge, Injektion, Spannung)	überprüfen
	falsche Position der Gefäße	korrigieren
	Analyt nicht in Lösung	anderes Lösungsmittel
		Lösungsvermittler
		niedrigere Konzentration
	zu kurze Laufzeit	verlängern
	Detektionsfenster falsch ausgerichtet	korrigieren
	Reste der Beschichtung am Detektionsfenster	nachbrennen, reinigen
	Lampe alt	ersetzen
	Datenaufnahme falsch eingestellt	korrigieren

Tab. 7.1 a

Sichtbare Auswirkung	Problem	Lösungsmöglichkeit
3. Auftreten von unerwarteten Peaks	Verunreinigungen	Lösung neu ansetzen
	zu viele Pufferkomponenten	anderen Puffer verwenden
	großer pH-Unterschied Analyt / Puffer	angleichen
	zu hohe Probenkonzentration	verdünnen
		höhere Pufferkonzentration
		anderes Puffersystem
		herabsetzen der Injektionszeit
	Adsorption an Kapillarwand	Salzzusatz
		anderer pH-Wert
		geeignete Spülsubstanzen verwenden
	Luftblasen	Ultraschallbad
		filtrieren
	Ablösen der Beschichtung (bei beschichteten Kapillaren)	keine aggressiven Reagenzien verwenden
		Kapillare wechseln
4. Schlechte Peakform (s. auch unter 3.)	Polyimid-Beschichtung aufgequollen	überprüfen und Kapillare ggf. ersetzen
	Kapillarenden ungerade	nachschneiden
5. Schlecht reproduzierbare Migrationszeiten (s. auch unter 3.)	Pufferprobleme	richtigen Puffer wählen
		ggf. Konzentration erhöhen
	ungenügende Äquilibration	Zeit verlängern
		auch ausreichend Konditionieren
	Verdunstung von Pufferbestandteilen	Deckel verwenden
		Puffer überschichten
6. Schlecht reproduzierbare Peakflächen (s. auch unter 3.)	Probenverarmung (vor allem bei elektrokinetischer Injektion, vgl. Kap. 6.3.2)	Probengefäß wechseln
7. Sonstiges	Drift in Schaltkreisen	
	nahe Wechselstromleitungen	
	Fehler im Vakuumsystem	
	Temperatureinflüsse auf Detektoren	
	Einflüsse von Festplattenzugriffen	
	Alterung von Glasfaserkabeln	

Tab. 7.1 b

8 Zusammenfassung und Ausblick

Diese Arbeit behandelt das Thema „Methodenentwicklung in der Kapillarelektrophorese“ anhand einiger recht unterschiedlicher Methoden.

Die Grundlagen der Kapillarelektrophorese werden in Kapitel 1 dargestellt. Nach der Erläuterung der Mechanismen der elektrophoretischen Trennung wird auf die verschiedenen Methoden näher eingegangen.

In Kapitel 3 wird eine Methode entwickelt, welche es ermöglicht, verschiedene Probemoleküle praktisch gleichen Masse/Ladungs-Verhältnisses nach deren Masse bzw. Größe zu trennen. Dies wird mit einer unbeschichteten Kieselglaskapillare unter Verwendung von Pufferlösungen mit polymeren Zusatzstoffen erreicht. Bei den bisher in der Literatur beschriebenen Methoden wurde die Kapillare entweder mit einem festen oder mit einem dynamischen Gel gefüllt, in jedem Fall wurden beschichtete Kapillaren verwendet. Dies hat einerseits den Nachteil, daß mit den beschichteten Kapillaren, abgesehen von der Schwierigkeit der Beschichtung bzw. des hohen Kaufpreises, sehr sorgsam umgegangen werden muß (je nach Beschichtung kann eine Kühlung notwendig sein, teilweise ist eine Behandlung mit Säure oder Lauge zu vermeiden), andererseits kann aus Veränderungen von Beschichtung und Gel eine verminderte Reproduzierbarkeit resultieren. Wie aus den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten deutlich wird, weist die hier angewandte Vorgehensweise noch ein großes Entwicklungspotential auf.

In Kapitel 4 konnte mit der Trennung von Taurolidin von seinen Verunreinigungen die Leistungsfähigkeit der Mizellaren Elektrokinetischen Chromatographie dargestellt werden. Hier wird der Unterschied zu einer Methode ohne Einsatz oberflächenaktiver Substanzen sehr deutlich: Zunächst ist für das untersuchte Substanzgemisch nur ein Peak erkennbar, der bei Anwendung einer MEKC-Methode (Verwendung eines SDS-haltigen Puffers) in die entsprechenden, zu den verschiedenen Substanzen gehörigen Peaks aufgespalten wird. Da Taurolidin in wäßriger Lösung nicht selbst nachgewiesen werden kann, da es sich zu Taurultam zersetzt, werden auch Experimente unter Verwendung weiterer Pufferzusätze durchgeführt. Letztendlich können die besten Ergebnisse durch eine Optimierung der SDS-Konzentration erzielt werden.

Das darauffolgende Kapitel 5 zeigt in seinem ersten Teil recht eindrucksvoll die Einfachheit und Leistungsfähigkeit der Kapillarelektrophorese zur Durchführung chiraler Trennungen. Einem Standardpuffer wird das entsprechende Cyclodextrin zugesetzt, um eine Trennung der betreffenden Substanz in ihre Enantiomere zu erreichen. Im letzten Teil des Kapitels, in welchem ein Kronenether als chiraler Selektor zum Einsatz kommt, zeigen sich auch die Grenzen dieser Methode: Der Ether ist nicht in Lösung zu bringen, und so kann er auch nicht für chirale Trennungen in wässriger Lösung eingesetzt werden. In dem dort zitierten Artikel wird der Kronenether als wasserlösliche Tetracarbonsäure eingesetzt.

Das letzte experimentelle Kapitel 6 demonstriert die Möglichkeiten zur Verbesserung der Detektionsgrenze mit Hilfe verschiedener Injektionstechniken. So können auch niedrigste Konzentrationen bestimmter Analyten mittels Kapillarelektrophorese detektiert werden. Dazu wird einmal als anionische Substanz Trimellitsäure, dann als kationische Substanz Neostigminbromid verwendet. Durch eine spezielle Injektions- und Aufkonzentrierungsmethode kann Trimellitsäure bis zu einer Konzentration von 0,1 ng/ml nachgewiesen werden. Liegt eine Substanz vor, die mit der gewählten Detektionsart (hier UV) selbst nicht sichtbar ist, so kann auch ein für die indirekte Detektion geeigneter Puffer verwendet werden. In Kapitel 3 wurde z. B. ein 1,2,4-Benzoltricarbonsäure-Puffer beschrieben. Um auch ungeladene Analyten aufkonzentrieren zu können, müssen geladene Substanzen verwendet werden, welche mit diesen Wechselwirkungen eingehen. Hier kommen z. B. SDS, Natriumcholat und andere Tenside in Betracht (Tab. 4.1).

In den Kapiteln 3 bis 6 konnte die Leistungsfähigkeit der Kapillarelektrophorese, sowohl was schwierige Trennungen als auch was die Detektion äußerst niedriger Konzentrationen an Analyt betrifft, eindrucksvoll dargestellt werden. Mögliche Fehlerquellen, die es bei der CE wie bei jeder analytischen Technik gibt, werden in Kapitel 7 in einer Übersicht kurz dargestellt. Werden Fehler sorgsam vermieden, dann steht mit der CE eine der leistungsfähigsten Trenntechniken für nichtflüchtige Substanzen zur Verfügung.

CD	Cyclodextrin
CE	Kapillarelektrophorese
CGE	Kapillargelelektrophorese
CIEP	Kapillarisoelektrophorese
CITP	Kapillarisotachophorese
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
DMF	Dimethylformamid
EG	Ethylenglykol
EOF	Elektroosmotischer (auch endoosmotischer) Fluß
FAI	Field amplified sample injection
FASS	Field amplified sample stacking
GC	Gaschromatographie
HDB	Hexadimethrinbromid
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HPSEC	Größenausschlußchromatographie
IS	Interner Standard
IP	Isoelektrischer Punkt
LC	Flüssigchromatographie
LiPFOS	Lithiumperfluorooctansulfonat
LOD	Detektionsgrenze (limit of detection)
MEKC	Mizellare Elektrokinetische Chromatographie
MS	Massenspektrometrie
NSM	„Normal stacking mode“
OPT	o-Phthalaldehyd-ethanthiol
PEG	Polyethylenglykol
rPCGE	Umkehrphasen-Gelelektrophorese
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
VT	Volumenteile

10 Experimentelles

10.1 Verwendete Geräte

Geräteart	Bezeichnung	Hersteller	Software / Betriebssystem
Kapillar- elektrophorese	Unicam Crystal CE 310	Thermo Finnigan	CE Control 1.3β (Gerätesteuerung) und 4880 Data Handling System (Datenaufnahme) / Windows 3.11
Kapillar- elektrophorese	SpectraPhoresis 1000	Thermo Finnigan	PC 1000 Software 3.0.3 / OS/2 Warp 3.0

Tab. 10.1: Meßgeräte

10.2 Kapillaren

Als Trennmedium für die Kapillarelektrophorese wurden unbeschichtete Kieselglaskapillaren der Firma Polymicro (Phoenix, Arizona, USA) mit einem Innendurchmesser von 25 µm verwendet. Die Gesamtlänge der Kapillaren betrug beim Unicam-Gerät 60 cm (45 cm bis zum Detektor), beim Spectra Phoresis 1000 42,5 cm (35 cm bis zum Detektor).

Die Kapillaren wurden 30 min mit 1 M Natronlauge bei 50°C äquilibriert und mit dem Laufpuffer 2 h bei 25°C konditioniert, wobei die entsprechende Trennspannung angelegt wurde.

Beim Unicam-Gerät wurden die jeweiligen Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt, da der Kapillarraum nur beheizbar, nicht aber kühlbar ist, so daß ein Abkühlen vor dem nächsten Schritt zu viel Zeit in Anspruch nehmen würde.

10.3 Methoden und Puffer

10.3.1 Puffer für Trennungen mit polymere Zusatzstoffen

Als Ausgangsbasis wurde ein Puffer für die indirekte Detektion verwendet, welcher im Falle von Pentosanpolysulfat auch ohne Polymerzusatz gute Ergebnisse lieferte.

Der Basispuffer wird wie folgt hergestellt:

2,10 g (10 mM) Trimellitsäure (Benzoltricarbonsäure, [528-44-9]) werden in ca. 800 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit 0,1 M Natronlauge auf 4,9 eingestellt, soweit nicht anders angegeben. Dann wird mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

Diesem wurden verschiedene Polymere zugesetzt:

Agarose, Dextran 60.000 und 500.000 und PEG 20.000:

Polymer	Gef.	CAS-Nr.	Konzentration	Lieferant
Agarose	-	[9012-36-6]	0,1%	Fluka
Dextran 60.000	-	[9004-54-0]	1 – 3%	Fluka
Dextran 500.000	-	[9004-54-0]	0,5 - 3%	Fluka
PEG 20.000	-	[25322-68-3]	1%	Merck-Schuchardt

Tab. 10.2: Polymerzusätze

10.3.2 Puffer für die Trennung von Taurolidin

Taurolidin wurde mit einer MEKC-Methode von seinen Verunreinigungen getrennt.

Anfangs wurde ein Phosphatpuffer folgender Rezeptur verwendet:










779,2 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ und 61,9 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ werden in 100 ml Wasser gelöst (Phosphat 60 mM, pH = 6,0).

Da dadurch keine Trennung erzielt wurde, wurde mit folgendem Puffer weiter gearbeitet:

2,38 g Natriumtetraborat und 7,21 g Natriumlaurylsulfat (SDS) werden in 250 ml Wasser gelöst (Konzentration je 100 mM, pH \approx 9).

Als Pufferzusätze kamen neben SDS noch Acetonitril, Brij 35 P, Cholsäure, verschiedene Cyclodextrine (s. Tab. 10.4), Deoxycholsäure, Ethylenglykol, Formaldehyd, Harnstoff (s. Tab.

10.4), 1-Hexanol, Lithiumperfluorooctansulfonat (LiPFOS), Triton X-100 sowie Tween 20 zum Einsatz:

Substanz	Gef.	CAS-Nr.	Konzentration	Lieferant
Acetonitril		[75-05-8]	1,7 – 10 %	Merck
Brij 35 P	-	[9002-92-0]	25 mM	Fluka
Cholsäure Natriumsalz		[361-09-1]	5 – 25 %	Fluka
Deoxycholsäure Natriumsalz		[302-95-4]	5 – 10 %	Fluka
Ethylenglykol		[107-21-1]	10 – 30 %	Fluka
Formaldehyd		[50-00-0]	17,5 – 37 %	Fluka
1-Hexanol		[111-27-3]	0,5 – 2 %	Fluka
LiPFOS		[29457-72-5]	10 – 40 mM	Fluka
SDS		[151-21-3]	25 – 200 mM	Merck
Triton X-100		[9002-93-1]	1,7 %	Fluka
Tween 20	-	[9005-64-5]	1 – 4 %	Fluka

Tab. 10.3

Hier noch einige Angaben zur Einwaage der Pufferzusätze:

Brij 35, 25 mM ($M = 1199,570 \text{ g/mol}$) [9002-92-0]:

299,9 mg	10 ml
149,9 mg	5 ml

Cholat-Lösung 25 ml ($M = 430,57 \text{ g/mol}$) [361-09-1]

53,8 mg	5 mM
107,6 mg	10 mM
161,5 mg	15 mM

Deoxycholat-Lösung 25 ml ($M = 414,57 \text{ g/mol}$) [302-95-4]

51,8 mg	5 mM
103,6 mg	10 mM
155,5 mg	15 mM

LiPFOS-Lösung 25 ml [29457-72-5]:

445 μ l	10 mM
890 μ l	20 mM
1335 μ l	30 mM
1780 μ l	40 mM

(verwendet wird eine 25%ige LiPFOS-Lösung)

SDS 100 mM ($M = 288,38 \text{ g / mol}$) [151-21-3]:

7,21 g	250 ml
5,768 g	200 ml
2,884 g	100 ml
1,442 g	50 ml

Tween 20, 25 mM ($M \approx 1228 \text{ g / mol}$) [9005-64-5]:

	278 μ l bzw. 0,307 g	10 ml
1 % (9 mM)	100 μ l bzw. 0,111 g	10 ml
2 % (18 mM)	200 μ l bzw. 0,221 g	10 ml
3 % (27 mM)	300 μ l bzw. 0,332 g	10 ml
4 % (36 mM)	400 μ l bzw. 0,442 g	10 ml

10.3.3 Puffer für chirale Trennungen

Für chirale Trennungen wurde als Ausgangsbasis ein Phosphatpuffer verwendet, der wie folgt hergestellt wird:

1,7011 g Kaliumdihydrogenphosphat [7778-77-0] werden in 250 ml Wasser gelöst, so daß man einen 50 mM Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 2,5 erhält.

Je nach zu analysierendem Enantiomerenpaar wird das passende Cyclodextrin und bei Bedarf Harnstoff und (Hydroxypropyl)-methylcellulose zugesetzt:

Substanz	Gef.	CAS-Nr.	Konzentration	Lieferant
β-Cyclodextrin	-	[7585-39-9]	10 mM	Aldrich
Methyl-β-CD	-	[128446-36-6]	10 / 75 mM	Aldrich
(2-Hydroxypropyl)-β-CD	-	[136019-12-0]	10 mM	Aldrich
Heptakis-(2,6-di-O-Methyl)- β-CD	-	[51166-71-3]	10 mM	Aldrich
Harnstoff (Carbamid)	-	[57-13-6]	220 mM bzw. 2 – 8 %	Merck
(Hydroxypropyl)-methylcellulose	-	[9004-65-3]	0,05 %	Fluka

Tab. 10.4

10.3.4 Puffer zur Probenaufkonzentrierung

Natriumtetraborat 25 mM (100 mM Borat), pH ≈ 9,2:

2,38 g	250 ml
1,904 g	200 ml
0,952 g	100 ml
0,476 g	50 ml

11 Literaturverzeichnis

- [1] K. D. Altria (Hrsg.), Capillary Electrophoresis Guidebook, Humana Press, Totowa, NJ (USA), 1996.
- [2] J. P. Landers (Hrsg.), Handbook of Capillary Electrophoresis, CRC, Boca Raton, FL (USA), 2. Aufl. 1996.
- [3] H. Engelhardt, W. Beck, T. Schmitt, Kapillarelektrophorese – Methoden und Möglichkeiten, Vieweg, Braunschweig 1994.
- [4] H. Wätzig, Habilitationsschrift, Würzburg 1994.
- [5] M. Degenhardt, Diplomarbeit, Würzburg 1996.
- [6] J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, Anal. Chem. 53 (1981) 1298.
- [7] C. L. Rice, R. Whitehead, J. Phys. Chem. 69 (1965) 4017.
- [8] J. R. Mazzeo, I. S. Krull, Bio Techniques 10 (1991) 638.
- [9] R. Kuhn, S. Hofstetter-Kuhn, Capillary Electrophoresis: Principles and Practice, Springer, Berlin 1993.
- [10] Y. C. Bae, D. Soane, J. Chromatogr. A 652 (1993) 17.
- [11] D. L. Smisek, Electrophoresis 16 (1995) 2094.
- [12] C. Heller, J. Chromatogr. A 698 (1995) 19.
- [13] M. R. Schure, R. E. Murphy, Electrophoresis 16 (1995) 2074.
- [14] W. M. Sunada, H. W. Blanch, Electrophoresis 18 (1997) 2243.
- [15] O. J. Lumpkin, P. Dejardin, B. H. Zimm, Biopolymers 24 (1985) 1573.
- [16] P. G. De Gennes, Scaling Concepts in Polymer Physics, Cornell Univ. Press, Ithaca, NY (USA), 1979.
- [17] M. Bergmann, H. Claessens, C. Cramers, J. Microcolumn Sep. 10 (1998) 19.
- [18] P. D. Grossman, D. S. Soane, J. Chromatogr. 559 (1991) 257.
- [19] B. H. Zimm, J. Chem. Phys. 94 (1991) 2187.
- [20] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, Anal. Chem. 56 (1984) 111.
- [21] H. Wätzig, M. Degenhardt, A. Kunkel, Electrophoresis, 19 (1998) 2695.
- [22] J. P. Chervet, United States Patent 5,057,216, 15. Oktober 1991.

- [23] G. B. Gordon, United States Patent 5,061,361, 29. Oktober 1991.
- [24] J. L. Beckers, P. Bocek, Electrophoresis 21 (2000) 2747.
- [25] F. Kohlrausch, Ann. Phys. (Leipzig) 62 (1897) 209.
- [26] E. S. Yeung, Acc. Chem. Res. 22 (1989) 125.
- [27] A. Nardi, C. Desiderio, S. Fanali, Boll. Chim. Farm. 131 (1992) 253.
- [28] M. Degenhardt, Dissertation, Würzburg 2001.
- [29] Y.-C. Chao, C.-W. Wang, J. Chromatogr. A 663 (1994) 229.
- [30] Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze.
- [31] bene-Arzneimittel GmbH, München.
- [32] B. Schirm, Dissertation, Würzburg 2000.
- [33] Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie, 4. Auflage, Band 7, VCH Weinheim, 1974, 80.
- [34] Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie, 4. Auflage, Band 19, VCH Weinheim, 1980, 2.
- [35] Chromatography Catalog 350, Alltech, Deerfield, IL (USA), 469.
- [36] D. Volgger, A. J. Zemmann, G. K. Bonn, M. J. Antal Jr., J. Chromatogr. A 758 (1997) 263.
- [37] C. Gelfi, A. Orsi, F. Leoncini, P. G. Righetti, J. Chromatogr. A 689 (1995) 97.
- [38] J. Ren, A. Ulvik, P. M. Ueland, H. Refsum, Anal. Biochem. 245 (1997) 79.
- [39] M. Nakatani, A. Shibukawa, T. Nakagawa, Anal. Sci. 10 (1994) 1.
- [40] K. Tsuji, J. Chromatogr. B 662 (1994) 291.
- [41] S. Hjertén, J. Chromatogr. 347 (1985) 189.
- [42] S. Hjertén, K. Kubo, Electrophoresis 14 (1993) 390.
- [43] C. Yang, Z. El Rassi, Electrophoresis 19 (1998) 2278.
- [44] J. S. Green, J. W. Jorgenson, J. Chromatogr. 478 (1989) 63.
- [45] M. M. Bushey, J. W. Jorgenson, J. Chromatogr. 480 (1989) 301.
- [46] S. Suzuki, S. Honda, Electrophoresis 19 (1998) 2539.
- [47] Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, 5. Aufl., Springer, Heidelberg 1993.
- [48] C. Herdeis, W. A. Held, C. E. Weis, Dt. Patent, GWXXAW.
- [49] B. I. Knight, G. G. Skellern, G. A. Smail, M. K. Browne, R. W. Pfirmann, J. Pharm. Sci., 72 (1983) 705.
- [50] F. Erb, M. Imbenotte, J. P. Huvenne, M. Vankemmel, P. Scherpereel, R. W. Pfirmann, Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet., 8 (1983) 163.

- [51] A. D. Woolfson, D. F. McCafferty, S. P. Gorman, D. S. Jones, *Int. J. Pharm.* 48 (1988) 167.
- [52] A. D. Woolfson, S. P. Gorman, D. F. McCafferty, D. S. Jones, *Int. J. Pharm.* 49 (1989) 135.
- [53] H. T. Hood, G. A. Smail, G. G. Skellern, P. D. Jindal, M. K. Browne, R. W. Pfirrmann, *Talanta* 41 (1994) 107.
- [54] E. Myers, M. C. Allwood, M. J. Gidley, J. K. M. Sanders, *J. Appl. Bact.* 48 (1980), 89.
- [55] *Europäisches Arzneibuch*, 3. Ausgabe 1997, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart.
- [56] M.-L. Riekkola, S. K. Wiedmer, I. E. Valkó, H. Sirén, *J. Chromatogr. A* 792 (1997) 13.
- [57] D. Corradini, *J. Chromatogr. B* 699 (1997) 221.
- [58] C. F. Poole, S. K. Poole, M. H. Abraham, *J. Chromatogr. A* 798 (1998) 207.
- [59] *Medicine Worldwide*
<http://www.m-ww.de>.
- [60] H. C. Liu, T. J. Liu, Y. Y. Yang, Y. N. Hou, *Acta Pharmacologica Sinica* 22 (2001) 91.
- [61] H. Liu, Y. Hou, T. Liu, Y. Hu, Y. Yang, *Yaoxue Xuebao* 35 (2000) 40.
- [62] S. Rudaz, S. Cherkaoui, P. Dayer, S. Fanali, J. L. Veuthey, *J. Chromatogr. A* 868 (2000) 295.
- [63] B. Kurth, G. Blaschke, *Electrophoresis* 20 (1999) 555.
- [64] E. C. Y. Chan, P. C. Ho, *J. Chromatogr. B* 707 (1998) 287.
- [65] *educeth.ch*
<http://www.educeth.ch>
- [66] R. Kuhn, C. Steinmetz, T. Bereuter, P. Haas, F. Erni, *J. Chromatogr.* 666 (1994) 367.
- [67] W. Löwe, S. A. Brettreich, C. Dietrich, M. Weber, P. J. Luger, *J. Heterocyclic Chem.* 34 (1997) 1.
- [68] *Beilstein*.
- [69] M. Albin, P. D. Grossmann, S. E. Moring, *Anal. Chem.* 65 (1993) 489 A.
- [70] R.-L. Chien, S. Burgi, *J. Chromatogr.* 559 (1991) 141.
- [71] M. J. Wojtusik, M. P. Harrold, *J. Chromatogr. A* 671 (1994) 411.
- [72] F. Hißner, B. Dausch, J. Mattusch, K. Heinig, *J. Chromatogr. A* 853 (1999) 497.
- [73] L. Wuping, L. H. Kee, *Electrophoresis* 20 (1999) 2475.

- [74] S. Burgi, R.-L. Chien, *Anal. Biochem.* 202 (1992) 306.
- [75] N. Gökhan, S. Günter, H. Wätzig, Posterpräsentation, 3. EGSM, 23.-25.2.2001, Frankfurt am Main, <http://www.foncl.de/AKW/Poster.pdf>.
- [76] D. A. Skoog, J. J. Leary, *Instrumentelle Analytik – Grundlagen, Geräte, Anwendungen*, Springer, Berlin, 1996.
- [77] L. Baur, Dissertation, Würzburg 2002.
- [78] A. Kunkel, Dissertation, Würzburg 1999.
- [79] B. R. Thomas, S. Ghodbane, *J. Liq. Chromatogr.* 16 (1993) 1983.
- [80] K. Mistry, I. Krull, N. Grinberg, *Electrophoresis* 24 (2003) 1753.
- [81] R. Vespalec, P. Boèek, *Electrophoresis* 18 (1997) 843.
- [82] S. Fanali, *J. Chromatogr. A* 792 (1997) 227.
- [83] G. Gübitz, M. G. Schmid, *J. Chromatogr. A* 792 (1997) 179.
- [84] G. Vigh, A. D. Sokolowski, *Electrophoresis* 18 (1997) 2305.

Lebenslauf

Stefan Alfred Günter, geboren am 5. Februar 1969 in Ochsenfurt

9.1975 – 7.1979	Grundschule Ochsenfurt
9.1979 – 7.1988	Röntgen-Gymnasium Würzburg
11.1988 – 12.1996	Studium der Chemie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg; Diplomarbeit zum Thema „Präzisionsverbesserung durch interne Standards und andere relative Maße für Kapillarelektrophorese und Flüssigchromatographie“
11.1988 – 8.1990	Spanischstudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg mit Abschluß des Studienelements „Hispanicum“
10.1992 - 6.1993	5. Studienjahr Chemie (Anorganische, Technische und Koordinations- chemie, Technisches Zeichnen) an der Universität Salamanca, Spanien
seit 1.1997	Anfertigung der Dissertation im Bereich Pharmazeutische Analytik zum Thema: „Methodenentwicklung in der Kapillarelektrophorese: Trennungen von Polymeren und Enantiomeren / Mizellarelektrokinetische Chromatographie / Probenfokussierung“
1.1997 – 9.1999	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazie der Universität Würzburg Betreuung des Praktikums „Instrumentelle Analytik“ (4. Semester)
seit 10.1999	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische Chemie der Technischen Universität Braunschweig; Betreuung des Praktikums „Allgemeine und analytische Chemie der anorganischen Arzneistoffe, Hilfsstoffe und Schadstoffe (unter Einbeziehung von Arzneibuch-Methoden)“ (1. Semester)

Weitere Veröffentlichungen

Publikationen

A. Kunkel, S. Günter, H. Wätzig

„Determination of pharmaceuticals in plasma by capillary electrophoresis without sample pretreatment - Reproducibility, limit of quantitation and limit of detection“
Electrophoresis 1997, *18*, 1882-1889.

A. Kunkel, S. Günter, H. Wätzig

„Quantitation of acetaminophen and salicylic acid in plasma using capillary electrophoresis without sample pretreatment - Improvement of precision“
Journal of Chromatography A 1997, *768*, 125-133.

A. Kunkel, S. Günter, C. Dette, H. Wätzig

„Quantitation of insulin by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography - Method comparison and validation“
Journal of Chromatography A 1997, *781*, 445-455.

A. Kunkel, S. Günter, H. Wätzig

„Capillary electrophoresis for the quantitation of insulin in pharmaceutical quality control - Strategies to obtain maximum precision and comparison to HPLC“
American Laboratory 1998, *30 (21)*, 76C-89C.

H. Wätzig, S. Günter

„Capillary Electrophoresis - A High Performance Analytical Separation Technique“
Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2003, *41 (6)*, 724-738.

Tagungsbeitrag

A. Kunkel, S. Günter, C. Dette, H. Wätzig

„Quantitation of insulin by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography - Method comparison and validation“
HPCE '98, 31.1.-5.2.1998, Orlando, FL (USA).

